

## P. ENT COOPERATION TREA

PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
AMENDMENTS OF THE CLAIMS(PCT Rule 62 and  
Administrative Instructions, Section 417)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Mrs I. Diallo  
European Patent Office  
Erhardtstrasse 27  
D-80331 Munich  
ALLEMAGNE

in its capacity as International Preliminary Examining Authority

Date of mailing (day/month/year)  
10 May 2000 (10.05.00)International application No.  
PCT/EP99/07679International filing date (day/month/year)  
13 October 1999 (13.10.99)

Applicant

BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al

The International Bureau hereby informs the International Preliminary Examining Authority that no amendments under Article 19 have been received by the International Bureau (Administrative Instructions, Section 417).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

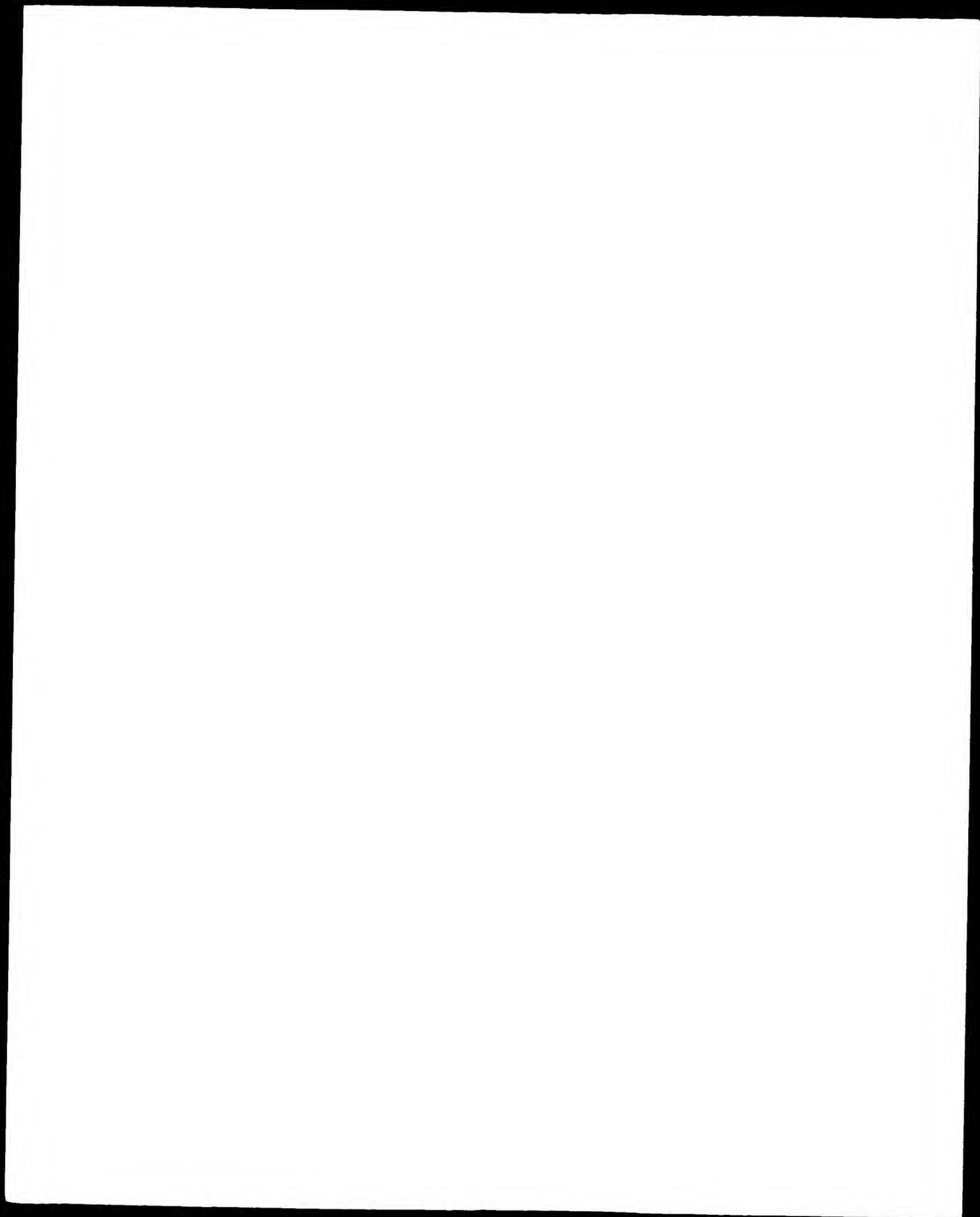
Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Juan Cruz

Telephone No. (41-22) 338.83.38

003274351



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)  
10 May 2000 (10.05.00)

International application No.  
PCT/EP99/07679

Applicant's or agent's file reference  
0050/049462

International filing date (day/month/year)  
13 October 1999 (13.10.99)

Priority date (day/month/year)  
19 October 1998 (19.10.98)

Applicant

RESS-LÖSCHKE, Marion et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
17 April 2000 (17.04.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

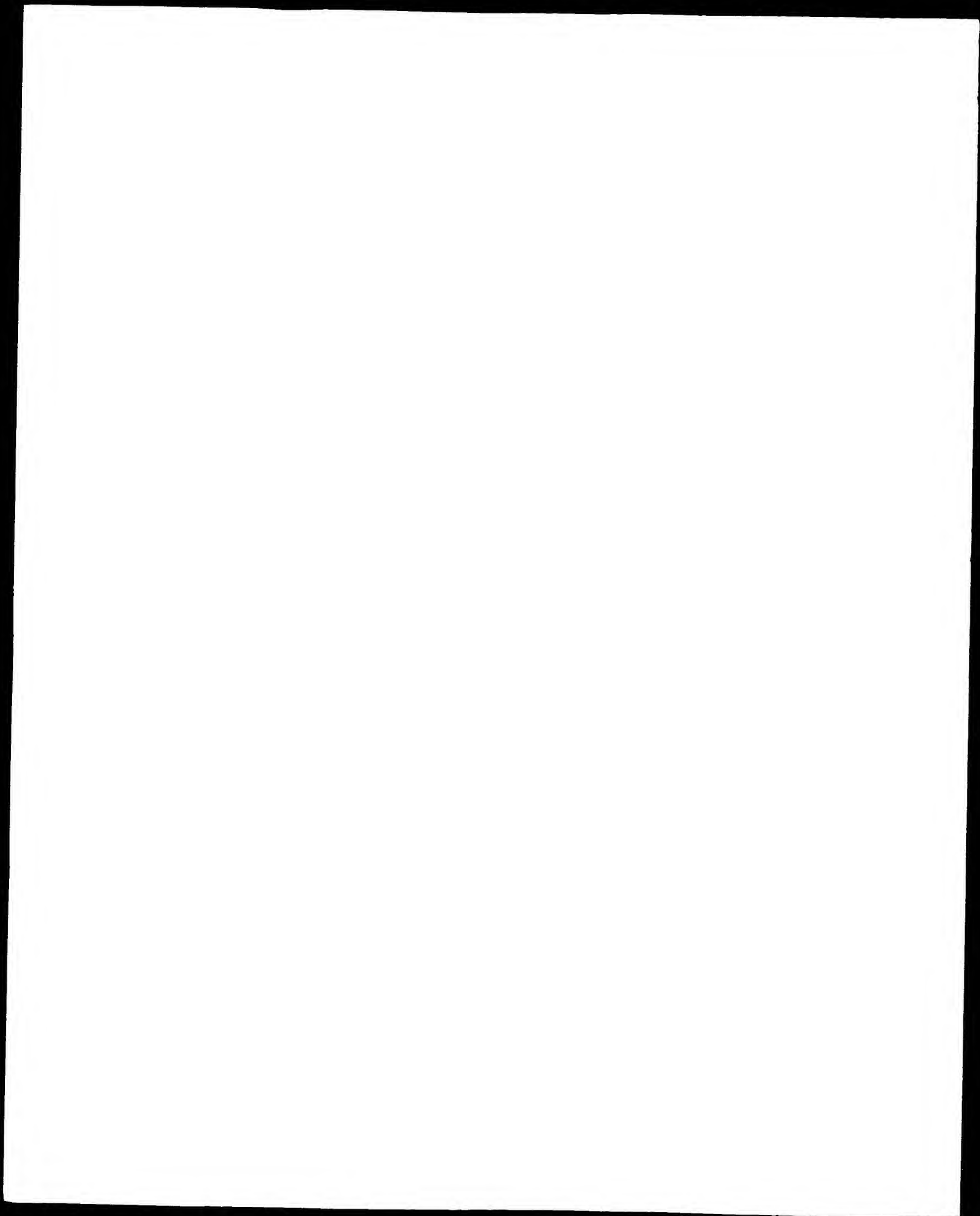
The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Juan Cruz

Telephone No.: (41-22) 338.83.38



VERTRAG FÜR DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>0050/049462</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 99/ 07679</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>13/10/1999</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>19/10/1998</b>
Anmelder  <b>BASF AKTIENGESellschaft et al.</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der Sprache ist die Internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die Internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz ist die Internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. \_\_\_\_\_

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☒ keine der Abb.

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

12

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N9/78 C12N15/55 C12N1/21 C12N15/63 C12P41/00  
C12P7/42 //(C12N9/78, C12R1:05)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KOBAYASHI M ET AL: "NITRILASE IN BIOSYNTHESIS OF THE PLANT HORMONE INDOLE-3-ACETIC ACID FROM INDOLE-3-ACETONITRILE: CLONING OF THE ALCALIGENES GENE AND SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF CYSTEINE RESIDUES" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, Bd. 90, 1. Januar 1993 (1993-01-01), Seiten 247-251, XP002036846 ISSN: 0027-8424 siehe Abbildung --- -/--	1,2



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. März 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

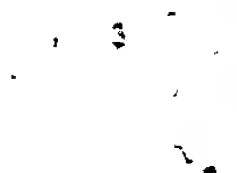
22/03/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3018

Bevollmächtigter Bediensteter

Alt, G





## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 00, no. 18471, 2. April 1994 (1994-04-02) & JP 06 153968 A (NITTO CHEM.IND. LTD), 3. Juni 1994 (1994-06-03) Zusammenfassung ---	1,2
X	NAGASAWA, T. ET AL.: "A novel nitrilase, arylacetonitrilase, of <i>Alcaligenes</i> <i>faecalis</i> JM3" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 194, 1990, Seiten 765-772, XP000881330 in der Anmeldung erwähnt siehe Seiten 767-769 ---	2
Y	EP 0 348 901 A (ASAHI CHEMICAL IND) 3. Januar 1990 (1990-01-03) siehe Beispiel 11 ---	1-15
Y	YAMAMOTO, K. ET AL.: "Purification and characterization of the nitrilase from <i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC8750 responsible for enantioselective hydrolysis of mandelonitrile" JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, Bd. 73, Nr. 6, 1992, Seiten 425-430, XP002132430 siehe das gesamte Dokument ---	1-15
Y	EP 0 449 648 A (NITTO CHEMICAL INDUSTRY CO LTD) 2. Oktober 1991 (1991-10-02) siehe Beispiele 2, 3 and 13; "Comparative Example" 1 -----	1-15



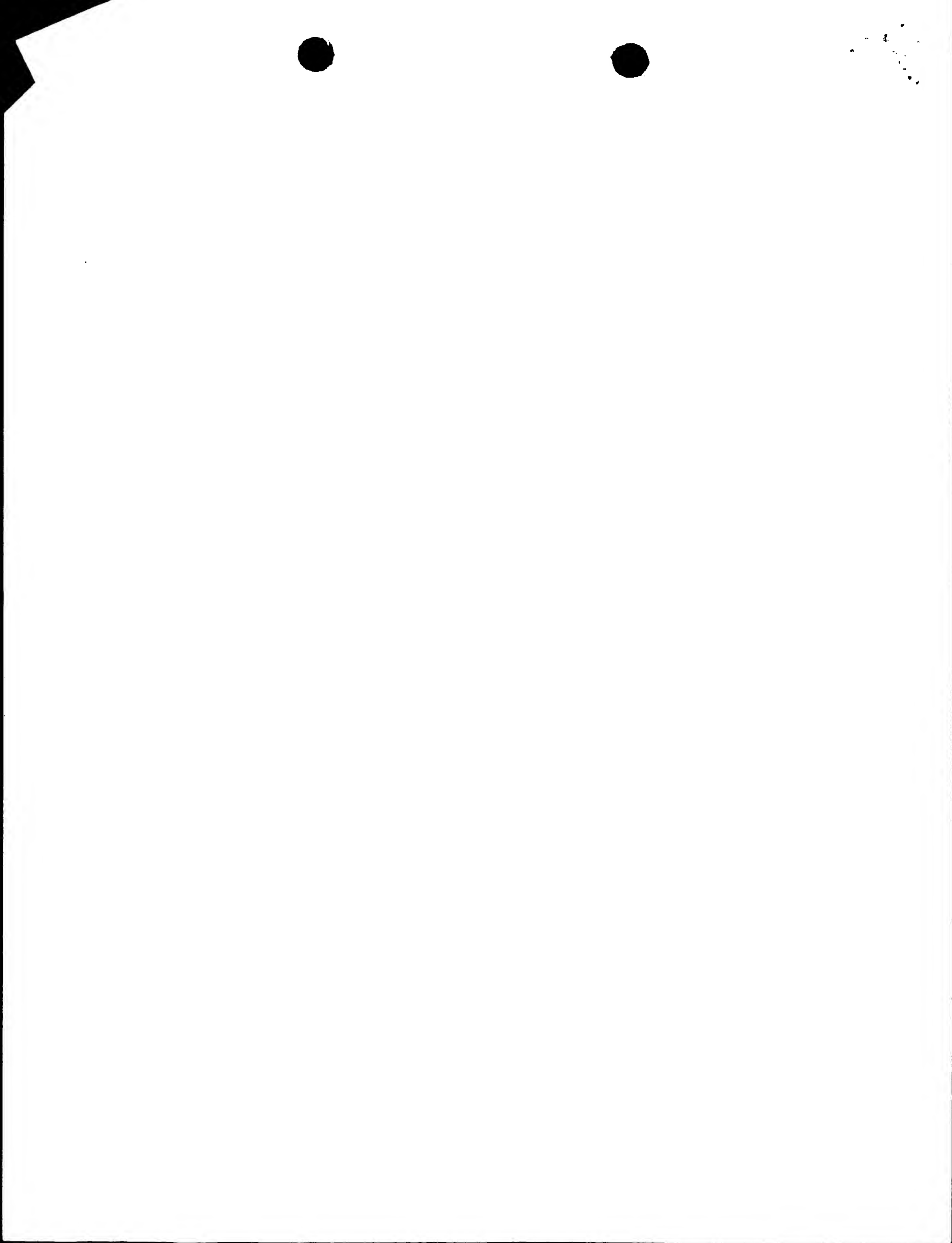
# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zu dieser Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07679

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
JP 06153968 A	03-06-1994	KEINE	
EP 0348901 A	03-01-1990	DE 68925002 D	18-01-1996
		DE 68925002 T	29-08-1996
		DK 314989 A	28-12-1989
		JP 2084198 A	26-03-1990
		JP 2623345 B	25-06-1997
		US 5283193 A	01-02-1994
EP 0449648 A	02-10-1991	JP 2696424 B	14-01-1998
		JP 4099495 A	31-03-1992
		JP 2698936 B	19-01-1998
		JP 4099496 A	31-03-1992
		DE 69131217 D	17-06-1999
		DE 69131217 T	23-09-1999
		JP 2696436 B	14-01-1998
		JP 4218385 A	07-08-1992
		US 5223416 A	29-06-1993



# VERTRAG ÜBER D ~~INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM~~ GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

RECEIVED 20 FEB 2001

PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT



(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0050/049462	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07679	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 13/10/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 19/10/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N9/78		
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
  
☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).  
  
 Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  17/04/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  16.02.01
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Alt, G  Tel. Nr. +49 89 2399 8545 



**I. Grundlage des Berichts**

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

**Beschreibung, Seiten:**

1-28                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-15                      ursprüngliche Fassung

**Zeichnungen, Nr.:**

1-6                        ursprüngliche Fassung

**Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:**

1-5, eingereicht mit Schreiben vom 23.12.99.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.





4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,      Seiten:
- ☐ Ansprüche,      Nr.:
- ☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	3, 14, 15
	Nein: Ansprüche	1,2,4-13
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-15
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-15
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen  
**siehe Beiblatt**

**VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:  
**siehe Beiblatt**



**Zu Punkt I**

**Grundlage des Bescheides**

1. Mit Schreiben vom 23.12.99 eingereichte Blätter 1-5 mit Sequenzprotokollen SEQ ID No. 1-9 sind nicht Bestandteil der Anmeldung (Regel 13ter.1 f) PCT).

**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

2. Punkt (c) des ersten Anspruchs ist unklar aus folgendem Grund: Dieser Teil des Anspruchs bezieht sich auf Derivate, der in SEQ ID No. 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz. Diese sind definiert dadurch, dass sie für Polypeptide mit der in SEQ ID No. 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 95% Homologie auf Aminosäureebene aufweisen.  
SEQ ID No. 2 bezieht sich auf **eine einzige** Aminosäuresequenz und nicht auf "Aminosäuresequenzen" wie im im Anspruch angegeben. Eine einzige Sequenz kann aber nicht 95% Homologie auf Aminosäureebene aufweisen.  
Es wird angenommen, dass der Anspruch richtigerweise lauten müsste: "..., die für Polypeptide codieren, deren enzymatische Wirkung nicht wesentlich reduziert ist und die mit der in SEQ ID No. 2 dargestellten Aminosäuresequenz mindestens 95% Homologie aufweisen."  
Für die folgende Prüfung wurde dieser Anspruchsteil so interpretiert. Abschnitt a und b von Anspruch 1 beziehen sich auf Nukleinsäurefragmente, die für ein Polypeptid mit der SEQ ID No. 2 codieren.

**Neuheit (Artikel 33(2) PCT)**

3. D1 = KOBAYASHI M ET AL: 'NITRILASE IN BIOSYNTHESIS OF THE PLANT HORMONE INDOLE-3-ACETIC ACID FROM INDOLE-3-ACETONITRILE: CLONING OF THE ALCALIGENES GENE AND SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF CYSTEINE RESIDUES' PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,US,NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, Bd. 90, 1. Januar 1993 (1993-01-01), Seiten 247-251



und D2 = NAGASAWA, T. ET AL.: 'A novel nitrilase, arylacetone nitrilase, of *Alcaligenes faecalis* JM3' EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 194, 1990, Seiten 765-772 beschreiben eine Nitrilase aus *Alcaligenes faecalis* JM3, die 96,3% Identität in 356 Aminosäuren mit der Nitrilase der Anmeldung hat. Das in Figur 1 von D1 beschriebene DNA-Fragment ist daher neuheitschädlich für den Gegenstand des ersten Anspruchs. Das gleiche gilt für das in dem japanischen "Patent-Abstract" (=D3) beschriebene Fragment. D2 beschreibt lediglich die Isolierung des Proteins und ist daher nicht neuheitsschädlich für Anspruch 1.

4. Das Produkt wird in Anspruch 2 und 3 durch die Nukleinsäure, die es codiert, definiert, d.h. durch den Prozess durch den es erhalten werden kann. Aufgrund dieser Definition fallen unter Anspruch 2 und 3 alle Proteine mit identischer Sequenz, auch wenn sie vielleicht durch Nukleinsäurefragmente erhalten wurden, die von denen aus Anspruch 1 wegen der Degeneriertheit des genetischen Codes differieren. Demgemäss sind D1-D3 neuheitsschädlich für den Gegenstand des Anspruchs 2.
5. Anspruch 3 beschreibt ein Protein mit einer Aminosäuresequenz, die mit der aus SEQ ID No. 2 identisch ist. Da ein solches Protein im Stand der Technik nicht beschrieben ist, ist der Gegenstand dieses Anspruchs neu.
6. Sowohl in D1 (Seite 448, zweite Spalte, die beiden letzten Abschnitte) als auch in D3 (das gesamte Abstrakt) wird das Nitrilase-Gen bakteriell exprimiert. Dazu muss das Gen in einen Vektor inseriert und an einen Promoter gekoppelt werden. Der Gegenstand der Ansprüche 4-6 ist im Lichte dieser Publikationen daher nicht neu.
7. D1 in Bezug auf D2 (Seite 248, erste Spalte, letzter Abschnitt, Referenz 11) und D2 (Seite 766, Abschnitt "Enzyme assay"; Legende zu Tabelle 5 beschreiben einen Enzymassay mit der gereinigten *Alcaligenes faecalis* JM3 Nitrilase, der alle Merkmale des in den Ansprüchen 8-13 charakterisierten Verfahrens besitzt. Der Gegenstand der Ansprüche 8-13 ist daher nicht neu.



**Erfinderische Tätigkeit**

8. Nächster Stand der Technik ist die Arylactonitrilase JM3 (zum Beispiel D1) oder die Nitrilase ATCC8750 (D4 = EP-A-348901), die beide aus *Alcaligenes faecalis* isoliert wurden.

Das vorliegende Protein stammt ebenfalls aus *Alcaligenes faecalis*, hat Nitrilase-Aktivität und reagiert bevorzugt mit aliphatischen Substraten (Tabelle 4).

Das der Anmeldung zugrunde liegende Problem war daher die Bereitstellung einer weiteren Arylacetoneitrilase.

Das Problem scheint mit der Bereitstellung der vorliegenden Nitrilase in naheliegender Weise gelöst zu sein. Dem Fachmann war bekannt, daß *Alcaligenes faecalis* Arylacetoneitrilasen produziert (siehe oben). Um eine weitere Nitrilase bereitzustellen, hätte der Fachmann daher eine solche nach den bekannten Verfahren aus einem weiteren *Alcaligenes*-Stamm isolieren können, bzw. eine bereits bekannte Nitrilase strukturell verändern können. Die Verwendung von Nitrilase-produzierenden Microorganismen zur Herstellung chiraler Carbonsäuren war aus dem Stand der Technik ebenfalls bekannt (z.B. EP-A-348 901). Da aufgrund der vorliegenden Daten eine spezielle und unerwartete Eigenschaft der beanspruchten Nitrilase nicht ersichtlich ist, scheint der Gegenstand der Ansprüche nicht auf erfinderischer Tätigkeit zu beruhen.

9. Nur wenn die spezifische Nitrilase der Anmeldung tatsächlich eine unerwartete Eigenschaft gegenüber den Nitrilasen des Standes der Technik (EP449648, Nitrilasen BC35-2, BC24, BC20, BC12-2; EP348901 Nitrilase ATCC8750; JP6-153968, Nitrilase JM3) besitzen sollte, könnte erfinderische Tätigkeit anerkannt werden.

**Zu Punkt VIII**

**Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

10. Punkt c des ersten Anspruchs ist unklar aus folgendem Grund: Der Teil des Anspruchs bezieht sich auf Derivate, die in SEQ ID No. 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz. Diese sind definiert dadurch, dass sie für Polypeptide mit der in SEQ ID No. 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 95% Homologie auf Aminosäureebene aufweisen (Artikel 6 PCT).





SEQ ID No. 2 bezieht sich auf **eine einzige** Aminosäuresequenz und nicht auf "Aminosäuresequenzen" wie im Anspruch angegeben. Eine einzige Sequenz kann aber nicht 95% Homologie auf Aminosäureebene aufweisen.

Der Anspruch sollte besser beispielsweise lauten: "..., die für Polypeptide codieren, deren enzymatische Wirkung nicht wesentlich reduziert ist und die mit der in SEQ ID No. 2 dargestellten Aminosäuresequenz mindestens 95% Homologie aufweisen."

11. Weiterhin sollte aus Klarheitsgründen in Anspruch 1c) der Ausdruck "über den gesamten Sequenzbereich" in den Anspruch aufgenommen werden (siehe beispielsweise Seite 13, Zeilen 5-6).
12. Die folgenden Angaben in der Beschreibung erwecken den Eindruck, daß der Gegenstand, für den Schutz begehrt wird, nicht dem in den Ansprüchen definierten Gegenstand entspricht, und führt daher zur Unklarheit (Artikel 6 PCT), wenn die Beschreibung zur Auslegung der Ansprüche herangezogen wird (vgl. die PCT Richtlinien, III-4.3a):  
Seite 3, Zeile 14: "**80%** Homologie" ( in den Ansprüchen: 95%)  
Seite 13, Zeilen 22-26: "Homologe der SEQ ID No. 1 besitzen auf DNA-Ebene eine Homologie von mindestens 60%....." (Es ist unwahrscheinlich, dass eine Homologie von 95% auf Aminosäureebene einer Homologie von 60% auf DNA-Ebene entspricht.)



## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 0050/049462	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/07679	International filing date (day/month/year) 13 October 1999 (13.10.99)	Priority date (day/month/year) 19 October 1998 (19.10.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 9/78, 15/55, 1/21, 15/63, C12P 41/00, 7/42, C12N 9/78		
Applicant BASF AKTIENGESELLSCHAFT		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.  
☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 17 April 2000 (17.04.00)	Date of completion of this report 16 February 2001 (16.02.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP  Facsimile No.	Authorized officer  Telephone No.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/07679

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages 1-28, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
pages 1-15, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the drawings:  
pages 1-6, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☒ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



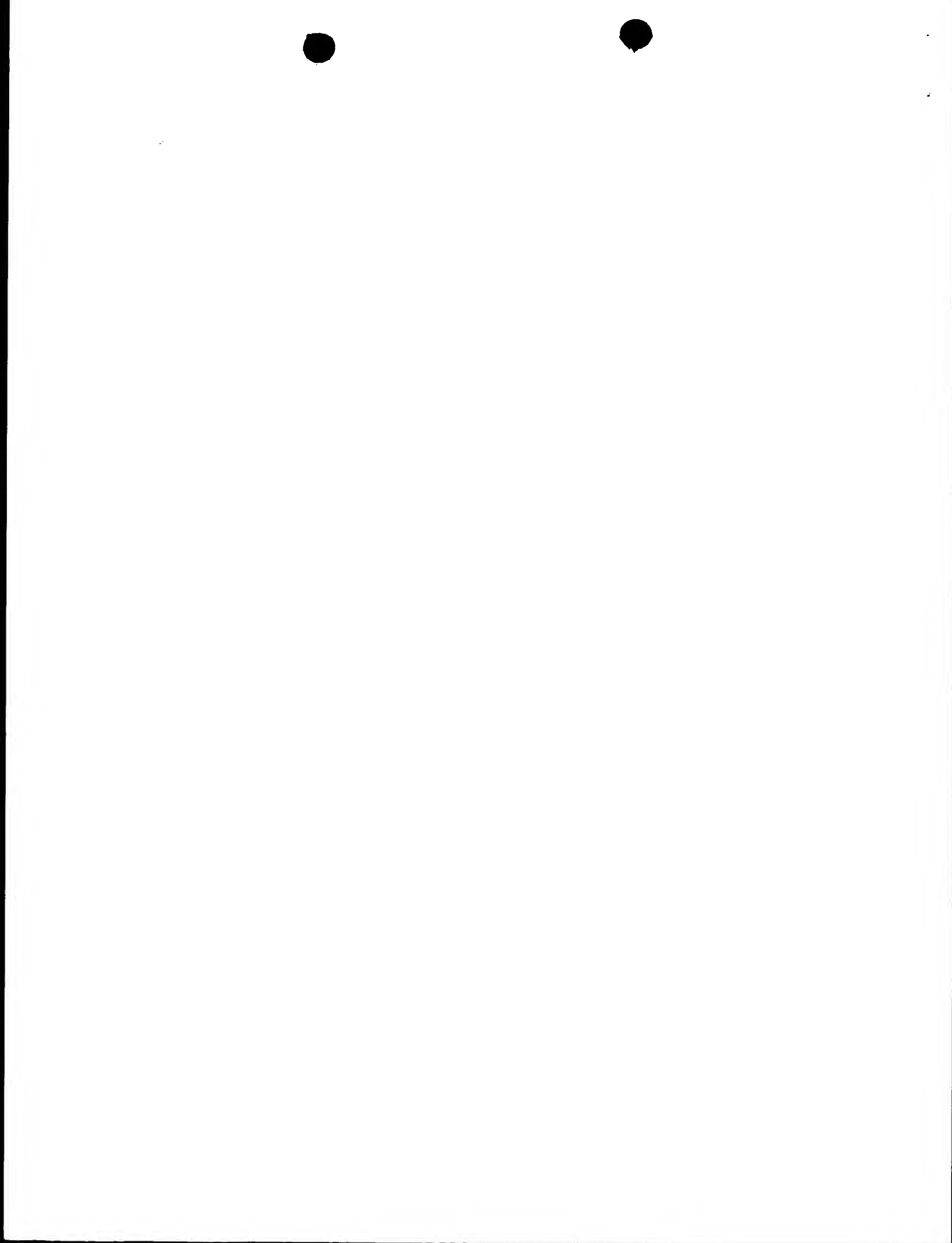
# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 99/07679

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

1. The sheets 1-5 submitted with the letter of 23 December 1999 and containing sequence protocols of SEQ. ID. No. 1-9 do not form part of the application (PCT Rule 13ter.1(f)).





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/07679

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	3, 14, 15	YES
	Claims	1, 2, 4-13	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-15	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

2. Point (c) of the first claim is unclear for the following reasons: this part of the claim concerns derivatives having the nucleic acid sequence represented by SEQ. ID. No. 1. These derivatives are defined by the fact that they code for polypeptides having the amino acid sequences represented by SEQ. ID. No. 2 and show at least 95% homology on the amino acid plane. SEQ. ID. No. 2 concerns **a single** amino acid sequence, not "amino acid sequences", as indicated in the claim. However, a single sequence cannot show 95% homology on the amino acid plane. It is assumed that the claim should read, to be correct: "which code for polypeptides whose enzymatic effect is not substantially reduced and show at least 95% homology with the amino acid sequence represented by SEQ. ID. No. 2".

This part of the claim was interpreted in this way for examination purposes. Sections (a) and (b) of Claim 1 concern nucleic acid fragments which code for a polypeptide having SEQ. ID. No. 2.



Novelty (PCT Article 33(2))

3. Documents D1 = KOBAYASHI M. ET AL.: "NITRILASE IN BIOSYNTHESIS OF THE PLANT HORMONE INDOLE-3-ACETIC ACID FROM INDOLE-3-ACETONITRILE: CLONING OF THE *ALCALIGENES* GENE AND SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF CYSTEINE RESIDUES", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, Vol. 90, 1 January 1993 (1993-01-01), pages 247-251, and D2 = NAGASAWA, T. ET AL.: "A novel nitrilase, arylacetonitrilase, of *Alcaligenes faecalis* JM3", EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Vol. 194, 1990, pages 765-772, describe a nitrilase from *Alcaligenes faecalis* JM3, which shows 96.3% identity with the claimed nitrilase over 356 amino acids. The DNA fragment described in Figure 1 of D1 is therefore detrimental to the novelty of the subject matter of the first claim. The same applies to the fragment described in the Japanese "Patent Abstract" (D3). D2 describes only the purification of the protein and is therefore not detrimental to the novelty of Claim 1.
4. The product is defined in Claims 2 and 3 by the nucleic acid which encodes it, that is by the process by which it can be obtained. Owing to this definition, Claims 2 and 3 cover all the proteins having an identical sequence, even if they may have been obtained using nucleic acid fragments which differ from those of Claim 1 because of the degeneration of the genetic code. Consequently, D1-D3 are detrimental to the novelty of the subject matter of Claim 2.
5. Claim 3 describes a protein having an amino acid



sequence identical to that of SEQ. ID. No. 2. Since the prior art does not describe such a protein, the subject matter of this claim is novel.

6. In both D1 (page 448, column 2, last two paragraphs) and D3 (the entire abstract), the nitrilase gene is bacterially expressed. For that purpose, the gene must be inserted into a vector and coupled to a promoter. Consequently, the subject matter of Claims 4-6 is not novel over those publications.
7. D1, referring to D2 (page 248, first column, last paragraph, reference 11) and D2 (page 766, paragraph "Enzyme assay"; legend to Table 5) describe enzyme assays with the purified *Alcaligenes faecalis* JM3 nitrilase which have all the features of the method specified in Claims 8-13. The subject matter of Claims 8-13 is therefore not novel.

#### Inventive step

8. The closest prior art is the arylacetone nitrilase JM3 (e.g. D1) or the nitrilase ATCC8750 (D4: EP-A-0 348 901), which are both isolated from *Alcaligenes faecalis*.

The present protein also originates from *Alcaligenes faecalis*, shows nitrilase activity and reacts preferably with aliphatic substrates (Table 4). The application therefore addressed the problem of producing a further arylacetone nitrilase.

The production of the present nitrilase appears to solve this problem in an obvious way. A person skilled in the art knew that *Alcaligenes faecalis*



produced arylacetonitrilases (see above). In order to produce a further nitrilase, a person skilled in the art would therefore have been able to isolate such a nitrilase from another *Alcaligenes* strain applying the known methods, or to structurally alter an already known nitrilase. The use of nitrilase-producing micro-organisms for producing chiral carboxylic acids was also known from the prior art (e.g. EP-A-0 348 901). Since the available data do not show a special and unexpected property of the claimed nitrilase, the subject matter of the claims does not appear to involve an inventive step.

9. An inventive step could be acknowledged only if the specific nitrilase claimed in the application actually displayed an unexpected property in relation to the prior art nitrilases (nitrilases BC35-2, BC24, BC20, BC12-2 of EP-A-0 449 648; nitrilase ATCC8750 of EP-A-0 348 901; nitrilase JM3 of JP-A-6 153 968).





## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

10. Point (c) of the first claim is unclear because this part of the claim concerns derivatives having the nucleic acid sequence represented by SEQ. ID. No. 1. These derivatives are defined by the fact that they code for polypeptides having the amino acid sequences represented by SEQ. ID. No. 2 and show at least 95% homology on the amino acid plane (PCT Article 6). SEQ. ID. No. 2 concerns **a single** amino acid sequence, not "amino acid sequences", as indicated in the claim. However, a single sequence cannot show 95% homology on the amino acid plane. It would be better if the claim read, for example: "which code for polypeptides whose enzymatic effect is not substantially reduced and show at least 95% homology with the amino acid sequence represented by SEQ. ID. No. 2".
11. In addition, for reasons of clarity, the expression "in the entire sequence range" should be included in Claim 1, point (c) (see, for example, page 13, lines 5-6).
12. The following indications in the description give the impression that the subject matter for which protection is sought does not correspond to the subject matter defined in the claims, and leads therefore to a lack of clarity (PCT Article 6) when the description is used to interpret the claims (see PCT Guidelines, Chapter III, 4.3a):  
  
page 3, line 14: "**80%** homology (95% in the claims);



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 99/07679

VIII. Certain observations on the international application

page 13, lines 22-26: "Homologues of SEQ. ID. No. 1 show at least 60% homology on the DNA plane..." (it is improbable that 95% homology on the amino acid plane should correspond to 60% homology on the DNA plane).



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> <b>C12N 9/78, 15/55, 1/21, 15/63, C12P 41/00, 7/42 // (C12N 9/78, C12R 1:05)</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/23577</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. April 2000 (27.04.00)</b>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/07679 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 13. Oktober 1999 (13.10.99) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 48 129.2 19. Oktober 1998 (19.10.98) DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> RESS-LÖSCHKE, Marion [DE/DE]; Ringstrasse 3, D-69221 Dossenheim (DE). FRIEDRICH, Thomas [DE/DE]; Saalbaustrasse 22-24, D-64283 Darmstadt (DE). HAUER, Bernhard [DE/DE]; Merowingerstrasse 1, D-67136 Fußgönheim (DE). MATTES, Ralf [DE/DE]; Friedrich-Zundel-Strasse 14, D-70619 Stuttgart (DE). ENGELS, Dirk [DE/DE]; Eichenstrasse 13, D-72141 Walddorfhäslach (DE). <b>(74) Gemeinsamer Vertreter:</b> BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
<b>(54) Title:</b> METHOD FOR PRODUCING CHIRAL CARBOXYLIC ACIDS FROM NITRILES WITH THE ASSISTANCE OF A NITRILASE OR MICROORGANISMS WHICH CONTAIN A GENE FOR THE NITRILASE <b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG CHIRALER CARBONSÄUREN AUS NITRILEN MIT HILFE EINER NITRILASE ODER MIKROORGANISMEN, DIE EIN GEN FÜR DIE NITRILASE ENTHALTEN <b>(57) Abstract</b> The invention relates to nucleic acid sequences which code for a polypeptide with nitrilase activity, to nucleic acid constructs containing the nucleic acid sequences, and to vectors containing the nucleic acid sequences or the nucleic acid constructs. The invention also relates to amino acid sequences which are coded by the nucleic acid sequences, and to microorganisms containing the nucleic acid sequences, the nucleic acid constructs or vectors containing the nucleic acid sequences or the nucleic acid constructs. In addition, the invention relates to a method for producing chiral carboxylic acids from the racemic nitriles. <b>(57) Zusammenfassung</b> Die Erfindung betrifft Nukleinsäuresequenzen, die für ein Polypeptid mit Nitrilaseaktivität codieren, Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend die Nukleinsäuresequenzen sowie Vektoren, enthaltend die Nukleinsäuresequenzen oder die Nukleinsäurekonstrukte. Die Erfindung betrifft weiterhin Aminosäuresequenzen, die durch die Nukleinsäuresequenzen codiert werden und Mikroorganismen enthaltend die Nukleinsäuresequenzen, die Nukleinsäurekonstrukte oder Vektoren enthaltend die Nukleinsäuresequenzen oder die Nukleinsäurekonstrukte. Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung chiraler Carbonsäuren aus den racemischen Nitrilen.		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zur Herstellung chiraler Carbonsäuren aus Nitrilen mit Hilfe einer Nitrilase oder Mikroorganismen, die ein Gen für die Nitrilase enthalten

5

#### Beschreibung

Die Erfindung betrifft Nukleinsäuresequenzen, die für ein Polypeptid mit Nitrilaseaktivität codieren, Nukleinsäurekonstrukte  
10 enthaltend die Nukleinsäuresequenzen sowie Vektoren enthaltend die Nukleinsäuresequenzen oder die Nukleinsäurekonstrukte. Die Erfindung betrifft weiterhin Aminosäuresequenzen, die durch die Nukleinsäuresequenzen codiert werden und Mikroorganismen enthaltend die Nukleinsäuresequenzen, die Nukleinsäurekonstrukte  
15 oder Vektoren enthaltend die Nukleinsäuresequenzen oder die Nukleinsäurekonstrukte.

Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung chiraler Carbonsäuren aus den racemischen Nitrilen.

20

Chirale Carbonsäuren sind gesuchte Verbindungen für die organischen Syntheschemie. Sie sind Ausgangsprodukte für eine Vielzahl von pharmazeutischen Wirkstoffen oder Wirkstoffen für den Pflanzenschutz. Chirale Carbonsäuren können zur klassischen  
25 Racematspaltung über Diastereomeresalze verwendet werden. So wird R-(-)- oder S-(-)-Mandelsäure beispielsweise zur Racematspaltung racemischer Amine eingesetzt. R-(-)-Mandelsäure wird außerdem als Zwischenprodukt bei der Synthese halbsynthetischer Antibiotika und einer Vielzahl landwirtschaftlicher Produkte genutzt wird.

30

Aus der Literatur sind eine Reihe verschiedener Synthesezugänge zu chiralen Carbonsäuren bekannt. So werden beispielsweise optisch aktive Aminosäuren technisch über fermentative Verfahren gewonnen. Von Nachteil dabei ist, daß für jede Aminosäure ein  
35 eigenes Verfahren entwickelt werden muß. Um eine möglichst breite Palette verschiedener Verbindungen herstellen zu können, werden deshalb chemische oder enzymatische Verfahren verwendet. Nachteilig bei den chemischen Verfahren ist, daß das Stereozentrum in der Regel in mehrstufigen, nicht breit anwendbaren Synthese  
40 umständlich aufgebaut werden muß.

Die enzymatische Synthese chiraler Carbonsäuren sind einer Reihe von Patenten oder Patentanmeldungen zu entnehmen. WO92/05275 beschreibt die Synthese enantiomerer  $\alpha$ -Hydroxy- $\alpha$ -alkyl- oder  
45  $\alpha$ -Alkylcarbonsäuren in Gegenwart biologischen Materials. In EP-B-0 348 901 wird ein Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven  $\alpha$ -substituierten organischen Säuren mit Mikroorganismen

der Gattungen *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Corynebacterium* sp. Stamm KO-2-4, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* und *Candida* beansprucht. Die Herstellung von L- $\alpha$ -Aminosäuren wird mit Mikroorganismen wird  
 5 in EP-B-0 332 379 beansprucht.

Die Herstellung von  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren speziell die Herstellung von optisch aktiver Milchsäure oder Mandelsäure mit verschiedenen Mikroorganismen wie Mikroorganismen der Gattungen  
 10 *Alcaligenes*, *Aureobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Caseobacter*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Brevibacterium*, *Nocardia*, *Variovorax*, *Arthrobacter* und *Candida* oder mit Enzymen wird in den Schutzrechten EP-A-0 348 901 oder seinem US-Äquivalent US 5,283,193,  
 15 EP-A-0 449 648, EP-B-0 473 328, EP-B-0 527 553 oder seinem US-Äquivalent US 5,296,373, EP-A-0 610 048, EP-A-0 610 049, EP-A-0 666 320 oder WO97/32030 beschrieben.

Von Nachteil bei diesen Prozessen ist, daß sie häufig nur zu  
 20 Produkten mit einer geringen optischen Reinheit führen und/oder daß sie nur mit geringen Raum-Zeit-Ausbeuten ablaufen. Dies führt zu wirtschaftlich unattraktiven Prozessen. Auch der Versuch durch Zugabe von Substanzen wie Sulfit, Disulfit, Dithionit, Hypophosphit oder Phosphit die Produktivität zu erhöhen (siehe  
 25 EP-A-0 486 289) oder über die Verwendung von Mikroorganismen, die eine erhöhte Resistenz gegenüber  $\alpha$ -Hydroxynitrilen aufweisen (siehe WO97/32030), führt zu keiner nennenswerten Steigerung der Produktivität.

30 Es war daher die Aufgabe der Erfindung ein leichtes, kostengünstiges, breit anwendbares Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven, chiralen Carbonsäuren zu entwickeln, das die oben genannten Nachteile nicht aufweist.

35 Diese Aufgabe wurde durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von chiralen Carbonsäuren der allgemeinen Formel I



dadurch gekennzeichnet, daß man racemische Nitrile der allgemeinen Formel II





in Gegenwart einer Aminosäuresequenz, die codiert wird durch eine Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten,
- 10 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 80 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die
- 15 enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist,

oder einem wachsenden, ruhenden oder aufgeschlossenen Mikroorganismus, der entweder eine Nukleinsäuresequenz aus der oben

20 genannten Gruppe oder ein Nukleinsäurekonstrukt, das eine Nukleinsäure aus der genannten Gruppe mit einem oder mehreren Regulationssignalen verknüpft, enthält, umsetzt und wobei mindestens 25 mmol Nitril/h pro mg Protein oder 25 mmol Nitril/h pro g Trockengewicht zu den chiralen Carbonsäuren umgesetzt

25 werden,

wobei die Substituenten und Variablen in den Formeln I und II folgende Bedeutung haben:

30 \* ein optisch aktives Zentrum

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> unabhängig voneinander Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Alkenyl-, substituiertes oder unsubstituiertes Aryl-, Hetaryl-, OR<sup>4</sup> oder NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup> und wobei die

35 Reste R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> immer unterschiedlich sind,

R<sup>4</sup> Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Alkenyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Alkenylcarbonyl-, Aryl-, Arylcarbonyl-, Hetaryl- oder Hetarylcarbonyl-,

40

R<sup>5</sup> Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Alkenyl-, Aryl- oder Hetaryl-, gelöst.

45

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> bezeichnen in den Verbindungen der Formeln I und II unabhängig voneinander Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Alkenyl-, substituiertes oder unsubstituiertes Aryl-,  
**5** Hetaryl-, OR<sup>4</sup> oder NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup> und wobei die Reste R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> immer unterschiedlich sind.

Als Alkylreste seien substituierte oder unsubstituierte verzweigte oder unverzweigte C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylketten wie beispielsweise  
**10** Methyl, Ethyl, n-Propyl, 1-Methylethyl, n-Butyl, 1-Methylpropyl-, 2-Methylpropyl, 1,1-Dimethylethyl, n-Pentyl, 1-Methylbutyl, 2-Methylbutyl, 3-Methylbutyl, 2,2-Dimethylpropyl, 1-Ethylpropyl, n-Hexyl, 1,1-Dimethylpropyl, 1,2-Dimethylpropyl, 1-Methylpentyl, 2-Methylpentyl, 3-Methylpentyl, 4-Methylpentyl, 1,1-Dimethyl-  
**15** butyl, 1,2-Dimethylbutyl, 1,3-Dimethylbutyl, 2,2-Dimethylbutyl, 2,3-Dimethylbutyl, 3,3-Dimethylbutyl, 1-Ethylbutyl, 2-Ethylbutyl, 1,1,2-Trimethylpropyl, 1,2,2-Trimethylpropyl, 1-Ethyl-1-methylpropyl, 1-Ethyl-2-methylpropyl, n-Heptyl, n-Octyl, n-Nonyl oder n-Decyl genannt. Bevorzugt sind Methyl, Ethyl, n-Propyl, n-Butyl,  
**20** i-Propyl oder i-Butyl.

Als Alkenylreste seien verzweigte oder unverzweigte C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Alkenylketten wie beispielsweise Ethenyl, Propenyl, 1-Butenyl, 2-Butenyl, 3-Butenyl, 2-Methylpropenyl, 1-Pentenyl,  
**25** 2-Pentenyl, 3-Pentenyl, 4-Pentenyl, 1-Methyl-1-butenyl, 2-Methyl-1-butenyl, 3-Methyl-1-butenyl, 1-Methyl-2-butenyl, 2-Methyl-2-butenyl, 3-Methyl-2-butenyl, 1-Methyl-3-butenyl, 2-Methyl-3-butenyl, 3-Methyl-3-butenyl, 1,1-Dimethyl-2-propenyl, 1,2-Dimethyl-1-propenyl, 1,2-Dimethyl-2-propenyl, 1-Ethyl-1-propenyl,  
**30** 1-Ethyl-2-propenyl, 1-Hexenyl, 2-Hexenyl, 3-Hexenyl, 4-Hexenyl, 5-Hexenyl, 1-Methyl-1-pentenyl, 2-Methyl-1-pentenyl, 3-Methyl-1-pentenyl, 4-Methyl-1-pentenyl, 1-Methyl-2-pentenyl, 2-Methyl-2-pentenyl, 3-Methyl-2-pentenyl, 4-Methyl-2-pentenyl, 1-Methyl-3-pentenyl, 2-Methyl-3-pentenyl, 3-Methyl-3-pentenyl, 4-Methyl-3-pentenyl,  
**35** 1-Methyl-4-pentenyl, 2-Methyl-4-pentenyl, 3-Methyl-4-pentenyl, 4-Methyl-4-pentenyl, 1,1-Dimethyl-2-butenyl, 1,1-Dimethyl-3-butenyl, 1,2-Dimethyl-1-butenyl, 1,2-Dimethyl-2-butenyl, 1,2-Dimethyl-3-butenyl, 1,3-Dimethyl-1-butenyl, 1,3-Dimethyl-2-butenyl, 1,3-Dimethyl-3-butenyl, 2,2-Dimethyl-3-butenyl,  
**40** 2,3-Dimethyl-1-butenyl, 2,3-Dimethyl-2-butenyl, 2,3-Dimethyl-3-butenyl, 3,3-Dimethyl-1-butenyl, 3,3-Dimethyl-2-butenyl, 1-Ethyl-1-butenyl, 1-Ethyl-2-butenyl, 1-Ethyl-3-butenyl, 2-Ethyl-1-butenyl, 2-Ethyl-2-butenyl, 2-Ethyl-3-butenyl, 1,1,2-Trimethyl-2-propenyl, 1-Ethyl-1-methyl-2-propenyl,  
**45** 1-Ethyl-2-methyl-1-propenyl, 1-Ethyl-2-methyl-2-propenyl, 1-Heptenyl, 2-Heptenyl, 3-Heptenyl, 4-Heptenyl, 5-Heptenyl, 6-Heptenyl, 1-Octenyl, 2-Octenyl, 3-Octenyl, 4-Octenyl,

5-Octenyl, 6-Octenyl, 7-Octenyl, Nonenyl oder Dekenyl genannt. Bevorzugt sind Ethenyl, Propenyl, Butenyl oder Pentenyl.

Als Aryl- seien substituiertes und unsubstituiertes Arylreste, die 6 bis 20 Kohlenstoffatome im Ring oder Ringsystem enthalten genannt. Dabei kann es sich um aneinander kondensierte aromatische Ringe handeln oder um aromatische Ringe, die über Alkyl-, Alkylcarbonyl-, Alkenyl- oder Alkenylcarbonylketten, Carbonyl, Sauerstoff oder Stickstoff verbrückt sind. Die Arylreste können gegebenenfalls noch über eine C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Alkenyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-Alkinyl- oder C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkylkette an das Grundgerüst gebunden sein. Bevorzugt sind Phenyl oder Naphtyl.

Als Hetaryl- seien substituierte oder unsubstituierte, einfache oder kondensierte aromatische Ringsysteme mit einem oder mehreren heteroaromatischen 3- bis 7gliedrigen Ringen, die ein oder mehrere Heteroatome wie N, O oder S enthalten können und gegebenenfalls über eine C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Alkenyl- oder C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkylkette an das Grundgerüst gebunden sein können, genannt. Beispiele für derartige Hetarylreste sind Pyrazol, Imidazol, Oxazol, Isooxazol, Thiazol, Triazol, Pyridin, Chinolin, Isochinolin, Acridin, Pyrimidin, Pyridazin, Pyrazin, Phenazin, Purin oder Pteridin. Die Hetarylreste können über die Heteroatome oder über die verschiedenen Kohlenstoffatome im Ring oder Ringsystem oder über die Substituenten an das Grundgerüst gebunden sein. Bevorzugt sind Pyridin, Imidazol, Pyrimidin, Purin, Pyrazin oder Chinolin.

Als Substituenten der genannten Reste von R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> oder R<sup>3</sup> kommen beispielsweise ein oder mehrere Substituenten wie Halogen wie Fluor, Chlor oder Brom, Thio, Nitro, Amino, Hydroxy, Alkyl, Alkoxy, Alkenyl, Alkenyloxy, Alkinyl oder weitere aromatischen oder weitere gesättigte oder ungesättigte nicht aromatische Ringen oder Ringsystemen in Frage. Bevorzugt sind Alkylreste wie C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl wie Methyl, Ethyl, Propyl oder Butyl, Aryl wie Phenyl, Halogen wie Chlor, Fluor oder Brom, Hydroxy oder Amino.

R<sup>4</sup> bezeichnet in den Resten OR<sup>4</sup> oder NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup> Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Alkenyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Alkenylcarbonyl-, Aryl-, Arylcarbonyl-, Hetaryl- oder Hetarylcarbonyl.

Als Alkylreste seien substituierte oder unsubstituierte verzweigte oder unverzweigte C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylketten wie beispielsweise Methyl, Ethyl, n-Propyl, 1-Methylethyl, n-Butyl, 1-Methylpropyl-, 2-Methylpropyl, 1,1-Dimethylethyl, n-Pentyl, 1-Methylbutyl,

2-Methylbutyl, 3-Methylbutyl, 2,2-Dimethylpropyl, 1-Ethylpropyl, n-Hexyl, 1,1-Dimethylpropyl, 1,2-Dimethylpropyl, 1-Methylpentyl, 2-Methylpentyl, 3-Methylpentyl, 4-Methylpentyl, 1,1-Dimethylbutyl, 1,2-Dimethylbutyl, 1,3-Dimethylbutyl, 2,2-Dimethylbutyl, 2,3-Dimethylbutyl, 3,3-Dimethylbutyl, 1-Ethylbutyl, 2-Ethylbutyl, 1,1,2-Trimethylpropyl, 1,2,2-Trimethylpropyl, 1-Ethyl-1-methylpropyl, 1-Ethyl-2-methylpropyl, n-Heptyl, n-Octyl, n-Nonyl oder n-Decyl genannt. Bevorzugt sind Methyl, Ethyl, n-Propyl, n-Butyl, i-Propyl oder i-Butyl.

10

Als Alkenylreste seien verzweigte oder unverzweigte C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Alkenylketten wie beispielsweise Ethenyl, Propenyl, 1-Butenyl, 2-Butenyl, 3-Butenyl, 2-Methylpropenyl, 1-Pentenyl, 2-Pentenyl, 3-Pentenyl, 4-Pentenyl, 1-Methyl-1-butenyl, 2-Methyl-1-butenyl, 3-Methyl-1-butenyl, 1-Methyl-2-butenyl, 2-Methyl-2-butenyl, 3-Methyl-2-butenyl, 1-Methyl-3-butenyl, 2-Methyl-3-butenyl, 3-Methyl-3-butenyl, 1,1-Dimethyl-2-propenyl, 1,2-Dimethyl-1-propenyl, 1,2-Dimethyl-2-propenyl, 1-Ethyl-1-propenyl, 1-Ethyl-2-propenyl, 1-Hexenyl, 2-Hexenyl, 3-Hexenyl, 4-Hexenyl, 5-Hexenyl, 1-Methyl-1-pentenyl, 2-Methyl-1-pentenyl, 3-Methyl-1-pentenyl, 4-Methyl-1-pentenyl, 1-Methyl-2-pentenyl, 2-Methyl-2-pentenyl, 3-Methyl-2-pentenyl, 4-Methyl-2-pentenyl, 1-Methyl-3-pentenyl, 2-Methyl-3-pentenyl, 3-Methyl-3-pentenyl, 4-Methyl-3-pentenyl, 1-Methyl-4-pentenyl, 2-Methyl-4-pentenyl, 3-Methyl-4-pentenyl, 4-Methyl-4-pentenyl, 1,1-Dimethyl-2-butenyl, 1,1-Dimethyl-3-butenyl, 1,2-Dimethyl-1-butenyl, 1,2-Dimethyl-2-butenyl, 1,2-Dimethyl-3-butenyl, 1,3-Dimethyl-1-butenyl, 1,3-Dimethyl-2-butenyl, 1,3-Dimethyl-3-butenyl, 2,2-Dimethyl-3-butenyl, 2,3-Dimethyl-1-butenyl, 2,3-Dimethyl-2-butenyl, 2,3-Dimethyl-3-butenyl, 3,3-Dimethyl-1-butenyl, 3,3-Dimethyl-2-butenyl, 1-Ethyl-1-butenyl, 1-Ethyl-2-butenyl, 1-Ethyl-3-butenyl, 2-Ethyl-1-butenyl, 2-Ethyl-2-butenyl, 2-Ethyl-3-butenyl, 1,1,2-Trimethyl-2-propenyl, 1-Ethyl-1-methyl-2-propenyl, 1-Ethyl-2-methyl-1-propenyl, 1-Ethyl-2-methyl-2-propenyl, 1-Heptenyl, 2-Heptenyl, 3-Heptenyl, 4-Heptenyl, 5-Heptenyl, 6-Heptenyl, 1-Octenyl, 2-Octenyl, 3-Octenyl, 4-Octenyl, 5-Octenyl, 6-Octenyl, 7-Octenyl, Nonenyl oder Dekenyl genannt. Bevorzugt sind Ethenyl, Propenyl, Butenyl oder Pentenyl.

40 Als Alkylcarbonylreste seien substituierte oder unsubstituierte verzweigte oder unverzweigte C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylcarbonylketten wie beispielsweise Methylcarbonyl, Ethylcarbonyl, n-Propylcarbonyl, 1-Methylethylcarbonyl, n-Butylcarbonyl, 1-Methylpropylcarbonyl-, 2-Methylpropylcarbonyl, 1,1-Dimethylethylcarbonyl, n-Pentylcarbonyl, 1-Methylbutylcarbonyl, 2-Methylbutylcarbonyl, 3-Methylbutylcarbonyl, 2,2-Dimethylpropylcarbonyl, 1-Ethylpropylcarbonyl, n-Hexylcarbonyl, 1,1-Dimethylpropylcarbonyl, 1,2-Dimethylpropyl-

- carbonyl, 1-Methylpentylcarbonyl, 2-Methylpentylcarbonyl, 3-Methylpentylcarbonyl, 4-Methylpentylcarbonyl, 1,1-Dimethylbutylcarbonyl, 1,2-Dimethylbutylcarbonyl, 1,3-Dimethylbutylcarbonyl, 2,2-Dimethylbutylcarbonyl, 2,3-Dimethylbutylcarbonyl, 3,3-Dimethylbutylcarbonyl, 1-Ethylbutylcarbonyl, 2-Ethylbutylcarbonyl, 1,1,2-Trimethylpropylcarbonyl, 1,2,2-Trimethylpropylcarbonyl, 1-Ethyl-1-methylpropylcarbonyl, 1-Ethyl-2-methylpropylcarbonyl, n-Heptylcarbonyl, n-Octylcarbonyl, n-Nonylcarbonyl oder n-Decylcarbonyl genannt. Bevorzugt sind Methylcarbonyl, Ethylcarbonyl, n-Propylcarbonyl, n-Butylcarbonyl, i-Propylcarbonyl oder i-Butylcarbonyl.

- Als Alkenylcarbonylreste seien verzweigte oder unverzweigte C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Alkenylcarbonylketten wie beispielsweise Ethenylcarbonyl, Propenylcarbonyl, 1-Butenylcarbonyl, 2-Butenylcarbonyl, 3-Butenylcarbonyl, 2-Methylpropenylcarbonyl, 1-Pentenylcarbonyl, 2-Pentenylcarbonyl, 3-Pentenylcarbonyl, 4-Pentenylcarbonyl, 1-Methyl-1-butenylcarbonyl, 2-Methyl-1-butenylcarbonyl, 3-Methyl-1-butenylcarbonyl, 1-Methyl-2-butenylcarbonyl, 2-Methyl-2-butenylcarbonyl, 3-Methyl-2-butenylcarbonyl, 1-Methyl-3-butenylcarbonyl, 2-Methyl-3-butenylcarbonyl, 3-Methyl-3-butenylcarbonyl, 1,1-Dimethyl-2-propenylcarbonyl, 1,2-Dimethyl-1-propenylcarbonyl, 1,2-Dimethyl-2-propenylcarbonyl, 1-Ethyl-1-propenylcarbonyl, 1-Ethyl-2-propenylcarbonyl, 1-Hexenylcarbonyl, 2-Hexenylcarbonyl, 3-Hexenylcarbonyl, 4-Hexenylcarbonyl, 5-Hexenylcarbonyl, 1-Methyl-1-pentenylcarbonyl, 2-Methyl-1-pentenylcarbonyl, 3-Methyl-1-pentenylcarbonyl, 4-Methyl-1-pentenylcarbonyl, 1-Methyl-2-pentenylcarbonyl, 2-Methyl-2-pentenylcarbonyl, 3-Methyl-2-pentenylcarbonyl, 4-Methyl-2-pentenylcarbonyl, 1-Methyl-3-pentenylcarbonyl, 2-Methyl-3-pentenylcarbonyl, 3-Methyl-3-pentenylcarbonyl, 4-Methyl-3-pentenylcarbonyl, 1-Methyl-4-pentenylcarbonyl, 2-Methyl-4-pentenylcarbonyl, 3-Methyl-4-pentenylcarbonyl, 4-Methyl-4-pentenylcarbonyl, 1,1-Dimethyl-2-butenylcarbonyl, 1,1-Dimethyl-3-butenylcarbonyl, 1,2-Dimethyl-1-butenylcarbonyl, 1,2-Dimethyl-2-butenylcarbonyl, 1,2-Dimethyl-3-butenylcarbonyl, 1,3-Dimethyl-1-butenylcarbonyl, 1,3-Dimethyl-2-butenylcarbonyl, 1,3-Dimethyl-3-butenylcarbonyl, 2,2-Dimethyl-3-butenylcarbonyl, 2,3-Dimethyl-1-butenylcarbonyl, 2,3-Dimethyl-2-butenylcarbonyl, 2,3-Dimethyl-3-butenylcarbonyl, 3,3-Dimethyl-1-butenylcarbonyl, 3,3-Dimethyl-2-butenylcarbonyl, 1-Ethyl-1-butenylcarbonyl, 1-Ethyl-2-butenylcarbonyl, 1-Ethyl-3-butenylcarbonyl, 2-Ethyl-1-butenylcarbonyl, 2-Ethyl-2-butenylcarbonyl, 2-Ethyl-3-butenylcarbonyl, 1,1,2-Trimethyl-2-propenylcarbonyl, 1-Ethyl-1-methyl-2-propenylcarbonyl, 1-Ethyl-2-methyl-1-propenylcarbonyl, 1-Ethyl-2-methyl-2-propenylcarbonyl, 1-Heptenylcarbonyl, 2-Heptenylcarbonyl, 3-Heptenylcarbonyl, 4-Heptenylcarbonyl, 5-Heptenylcarbonyl, 6-Heptenylcarbonyl,



1-Octenylcarbonyl, 2-Octenylcarbonyl, 3-Octenylcarbonyl, 4-Octenylcarbonyl, 5-Octenylcarbonyl, 6-Octenylcarbonyl, 7-Octenylcarbonyl, Nonenylcarbonyl oder Dekenylcarbonyl genannt. Bevorzugt sind Ethenylcarbonyl, Propenylcarbonyl, Butenylcarbonyl 5 oder Pentenylcarbonyl.

Als Aryl- seien substituiertes und unsubstituiertes Arylreste, die 6 bis 20 Kohlenstoffatome im Ring oder Ringsystem enthalten genannt. Dabei kann es sich um aneinander kondensierte 10 aromatische Ringe handeln oder um aromatische Ringe, die über Alkyl-, Alkylcarbonyl-, Alkenyl- oder Alkenylcarbonylketten, Carbonyl, Sauerstoff oder Stickstoff verbrückt sind. Die Arylreste können gegebenenfalls noch über eine C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Alkenyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-Alkynyl- oder C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkylkette an das 15 Grundgerüst gebunden sein. Bevorzugt sind Phenyl oder Naphtyl.

Als Arylcarbonyl- seien substituiertes und unsubstituiertes Arylcarbonylreste, die 6 bis 20 Kohlenstoffatome im Ring oder Ringsystem enthalten genannt. Dabei kann es sich um aneinander kondensierte 20 aromatische Ringe handeln oder um aromatische Ringe, die über Alkyl-, Alkylcarbonyl-, Alkenyl- oder Alkenylcarbonylketten, Carbonyl, Sauerstoff oder Stickstoff verbrückt sind. Bevorzugt sind Phenylcarbonyl oder Naphthylcarbonyl.

25 Als Hetaryl- seien substituierte oder unsubstituierte, einfache oder kondensierte aromatische Ringsysteme mit einem oder mehreren heteroaromatischen 3- bis 7gliedrigen Ringen, die ein oder mehrere Heteroatome wie N, O oder S enthalten können und gegebenenfalls über eine C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Alkenyl- oder 30 C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkylkette an das Grundgerüst gebunden sein können, genannt. Beispiele für derartige Hetarylreste sind Pyrazol, Imidazol, Oxazol, Isooxazol, Thiazol, Triazol, Pyridin, Chinolin, Isochinolin, Acridin, Pyrimidin, Pyridazin, Pyrazin, Phenazin, Purin oder Pteridin. Die Hetarylreste können über die Heteroatome 35 oder über die verschiedenen Kohlenstoffatome im Ring oder Ringsystem oder über die Substituenten an das Grundgerüst gebunden sein. Unter Hetarylcarbonylresten sind heteroaromatische Reste zu verstehen, die über einen Carbonylrest an das Grundgerüst gebunden sind. Bevorzugt sind Pyridin, Imidazol, Pyrimidin, Purin, 40 Pyrazin oder Chinolin.

Als Substituenten der genannten Reste von R<sup>4</sup> kommen beispielsweise ein oder mehrere Substituenten wie Halogen wie Fluor, Chlor oder Brom, Thio, Nitro, Amino, Hydroxy, Alkyl, Alkoxy, Alkenyl, Alkenyloxy, Alkynyl oder weitere aromatischen oder weitere gesättigte 45 oder ungesättigte nicht aromatische Ringen oder Ringsystemen in Frage. Bevorzugt sind Alkylreste wie C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl wie Methyl,

Ethyl, Propyl oder Butyl, Halogen wie Chlor, Fluor oder Brom, Hydroxy oder Amino.

Bevorzugt ist für den Rest  $R^4$  Wasserstoff.

5

$R^5$  bezeichnet im Rest  $NR^4R^5$  Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes  $C_1$ - $C_{10}$ -Alkyl-,  $C_2$ - $C_{10}$ -Alkenyl-, Aryl- oder Hetaryl-, wobei die Alkyl-, Alkenyl-, Aryl- und Hetarylreste die oben genannte Bedeutung haben. Bevor-

zugt ist Wasserstoff oder  $C_1$ - $C_{10}$ -Alkyl- wie Methyl, Ethyl oder Propyl.

Als Substituenten der genannten Reste von  $R^5$  kommen beispielsweise ein oder mehrere Substituenten wie Halogen wie Fluor, Chlor oder

Brom, Thio, Nitro, Amino, Hydroxy, Alkyl, Alkoxy, Alkenyl, Alkenyloxy, Alkinyl oder weitere aromatischen oder weitere gesättigte oder ungesättigte nicht aromatische Ringen oder Ringsystemen in Frage. Bevorzugt sind Alkylreste wie  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl wie Methyl, Ethyl, Propyl oder Butyl, Aryl wie Phenyl, Halogen wie Chlor, Fluor oder Brom, Hydroxy oder Amino.

Weiter können zwei benachbarte Substituenten  $R^4$  oder  $R^5$  zusammen einen weiteren substituierten oder unsubstituierten aromatischen, gesättigten oder teilweise gesättigten Ring mit 5 bis 6 Atomen im Ring bilden, der ein oder mehrere Heteroatome wie O, N oder S enthalten kann.

Vorteilhaft bedeutet einer der Substituenten  $R^1$ ,  $R^2$  oder  $R^3$  in den Formeln I und II Aryl wie Phenyl. Weiterhin bedeutet einer der

Substituenten  $R^1$ ,  $R^2$  oder  $R^3$  in den Formeln I und II bevorzugt Hydroxy und einer Wasserstoff oder Methyl.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorteilhaft bei einem pH-Wert von 4 bis 11, bevorzugt von 4 bis 9 durchgeführt.

35

Weiterhin werden im Verfahren vorteilhaft von 0,01 bis 10 Gew.-% Nitril oder 0,01 bis 10 Gew.-% eines entsprechenden Aldehyds oder Ketons und 0,01 bis 10 Gew.-% Blausäure verwendet. Vorteilhaft wird das Verfahren mit einem Überschuß an Blausäure durchgeführt.

Dies führt unter Umständen zu höheren als den angegebenen Blausäureanteilen. Je nach Nitril können unterschiedliche Mengen an Nitril in der Reaktion verwendet werden. Die geringsten Mengen an Nitril werden vorteilhaft bei Nitrilen (Cyanhydrine) verwendet (= Mengen zwischen 0,01 bis 5 Gew.-%), die im Gleichgewicht mit den entsprechenden Aldehyden und Blausäure stehen. Da der Aldehyd für die Mikroorganismen oder Enzyme in der Regel toxisch ist. Nitrile, die leicht flüchtig sind, werden ebenfalls vorteilhaft

in Mengen zwischen 0,01 bis 5 Gew.-% eingesetzt. Bei höheren Cyanhydrin- bzw. Nitrilmengen läuft die Reaktion verzögert ab. Bei Nitrilen, die nur geringe oder nahezu keine Lösungsmittleigenschaften haben oder Nitrilen, die sich nur in sehr geringen  
5 Mengen in wäßrigen Medium lösen, können vorteilhaft auch größere als die oben angegebenen Mengen eingesetzt werden. Zur Erhöhung des Umsatzes und der Ausbeute wird die Reaktion vorteilhafterweise unter kontinuierlicher Zugabe des racemischen Nitrils durchgeführt. Das Produkt kann nach Ende der Reaktion isoliert  
10 werden oder aber in einem Bypass kontinuierlich entfernt werden.

Unter den oben genannten, entsprechenden Aldehyden oder Ketonen sind Verbindungen zu verstehen, die nach Reaktion zwischen dem Aldehyd oder Keton und Blausäure ggf. unter Säurekatalyse das  
15 Nitril bilden. Die Reaktion zwischen Aldehyd und Blausäure führt zu Cyanhydrinen, die den Vorteil haben, daß sie mit Aldehyd und Blausäure im Gleichgewicht liegen. Durch die Gleichgewichtseinstellung des Cyanhydrins ist es möglich mit einem Enzym, das nur ein Enantiomer des Nitrils umsetzt, trotzdem zu 100 % Ausbeute  
20 in der Theorie zu kommen, da das racemische Nitril ständig nachgeliefert wird. Bei allen anderen Nitrilen wird das enzymatisch nicht umgesetzte Nitril (= "falsches" bzw. anderes Enantiomer) vorteilhaft über eine chemische Reaktion racemisiert und dem Verfahren wieder zugeführt, um eine theoretische Ausbeute von 100 %  
25 erreichen zu können, verworfen oder aufgereinigt und chemisch unter Erhalt des Stereozentrums verseift.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorteilhaft bei einer Temperatur zwischen 0°C bis 80°C, bevorzugt zwischen 10°C bis 60°C,  
30 besonders bevorzugt zwischen 15°C bis 50°C durchgeführt

Unter racemischen Nitrilen im erfindungsgemäßen Verfahren sind Nitrile zu verstehen, die aus einem 50:50 Gemisch der beiden Enantiomere oder aus einem beliebigen anderen Gemisch mit einer  
35 Anreicherung eines der beiden Enantiomere im Gemisch bestehen.

Unter chiralen Carbonsäuren sind im erfindungsgemäßen Verfahren zu verstehen, die eine Enantiomerenanreicherung zeigen. Bevorzugt werden im Verfahren Enantiomerenreinheiten von mindestens 90 %ee,  
40 bevorzugt von min. 95 %ee, besonders bevorzugt von min. 98 %ee, ganz besonders bevorzugt min. 99 %ee erreicht.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Umsetzung einer großen Vielzahl von racemischen Nitrilen zu den chiralen Carbon-  
45 säuren. Im Verfahren lassen sich mindestens 25 mmol Nitril/h x mg Protein oder mindestens 25 mmol Nitril/h x g Trockengewicht der Mikroorganismen umsetzen, bevorzugt mindestens 30 mmol Nitril/h x



mg Protein oder mindestens 30 mmol Nitril/h x g Trockengewicht, besonders bevorzugt mindestens 40 mmol Nitril/h x mg Protein oder mindestens 40 mmol Nitril/h x g Trockengewicht, ganz besonders bevorzugt mindestens 50 mmol Nitril/h x mg Protein oder mindestens 50 mmol Nitril/h x g Trockengewicht.

Für das erfindungsgemäße Verfahren können wachsende Zellen verwendet werden, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, Nukleinsäurekonstrukte oder Vektoren enthalten. Auch ruhende oder aufgeschlossene Zellen können verwendet werden. Unter aufgeschlossenen Zellen sind beispielsweise Zellen zu verstehen, die über eine Behandlung mit beispielsweise Lösungsmitteln durchlässig gemacht worden sind, oder Zellen die über eine Enzymbehandlung, über eine mechanische Behandlung (z.B. French Press oder Ultraschall) oder über eine sonstige Methode aufgebrochen wurden. Die so erhaltenen Rohextrakte sind für das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhaft geeignet. Auch gereinigte oder angereinigte Enzyme können für das Verfahren verwendet werden. Ebenfalls geeignet sind immobilisierte Mikroorganismen oder Enzyme, die vorteilhaft in der Reaktion Anwendung finden können.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten chiralen Carbonsäuren lassen sich vorteilhaft aus der wässrigen Reaktionslösung über Extraktion oder Kristallisation oder über Extraktion und Kristallisation gewinnen. Hierzu wird die wässrige Reaktionslösung mit einer Säure wie einer Mineralsäure (z.B. HCl oder H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) oder einer organischen Säure angesäuert vorteilhaft auf pH-Werte unter 2 und anschließend mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert. Die Extraktion kann zur Erhöhung der Ausbeute mehrfach wiederholt werden. Als organische Lösungsmittel können prinzipiell alle Lösungsmittel verwendet werden, die mit Wasser gegebenenfalls nach Zugabe von Salzen eine Phasengrenze zeigen. Vorteilhafte Lösungsmittel sind Lösungsmittel wie Toluol, Benzol, Hexan, Methyltertiärbutylether oder Essigester.

Nach Einengen der organischen Phase können die Produkte in der Regel in guten chemischen Reinheiten, das heißt größer 90 % chemische Reinheit, gewonnen werden. Nach Extraktion kann die organische Phase mit dem Produkt aber auch nur zum Teil eingeeengt werden und das Produkt auskristallisiert werden. Dazu wird die Lösung vorteilhaft auf eine Temperatur von 0°C bis 10°C abgekühlt. Die Kristallisation kann auch direkt aus der organischen Lösung erfolgen. Das auskristallisierte Produkt kann nochmals in im gleichen oder in einem anderen Lösungsmittel zur erneuten Kristallisation aufgenommen werden und nochmals kristallisiert werden. Durch die anschließende mindestens einmalige Kristalli-

sation kann die Enantiomerenreinheit des Produktes je nach Lage des Eutektikum weiter gesteigert werden.

Die chiralen Carbonsäuren können jedoch auch direkt nach Ansäuern  
5 mit einer Säure auf einen pH-Wert vorteilhaft unter 2 aus der wäßrigen Reaktionslösung auskristallisiert werden. Vorteilhaft wird dazu die wäßrige Lösung unter Erwärmen eingeengt und in ihrem Volumen um 10 bis 90 %, bevorzugt 20 bis 80 %, besonders bevorzugt 30 bis 70 % reduziert. Vorzugsweise wird die Kristalli-  
10 sation unter Kühlung durchgeführt. Temperaturen zwischen 0°C bis 10°C sind für die Kristallisation bevorzugt. Aus kostengründen ist die direkte Kristallisation aus der wäßrigen Lösung bevorzugt. Ebenfalls bevorzugt wird eine Aufarbeitung der chiralen Carbonsäuren über eine Extraktion und gegebenenfalls anschließen-  
15 der Kristallisation.

Bei diesen bevorzugten Aufarbeitungsarten läßt sich das Produkt des erfindungsgemäßen Verfahrens in Ausbeuten von 60 bis 100 %, bevorzugt von 80 bis 100 %, besonders bevorzugt von 90 bis 100 %  
20 bezogen auf das für die Reaktion eingesetzte Nitril isolieren. Das isolierte Produkt zeichnet sich durch eine hohe chemische Reinheit von > 90 %, bevorzugt > 95 % besonders bevorzugt von > 98 % aus. Weiterhin hat das Produkt eine hohe Enantiomerenreinheit, die durch die Kristallisation weiter gesteigert werden  
25 kann.

Die so gewonnenen Produkte eignen sich als Ausgangsmaterial für organischen Synthesen zur Herstellung von Pharmaka oder Agrochemikalien oder zur Racematspaltung.

30

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine isolierte Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit Nitrilaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:

35 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,

b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1 dargestellten  
40 Nukleinsäuresequenz ableiten,

c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 95 %  
45 Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.

- Unter Homologe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 sind beispielsweise Allelvarianten zu verstehen, die mindestens 95 % Homologie auf der abgeleiteten Aminosäureebene, bevorzugt mindestens 97 % Homologie, ganz besonders
- 5 bevorzugt mindestens 98 % Homologie über den gesamten Sequenzbereich aufweisen. Über Teilbereiche der Sequenzen können die Homologien vorteilhaft höher liegen. Die von SEQ ID NO: 1 abgeleitete Aminosäuresequenz ist SEQ ID NO: 2 zu entnehmen. Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die durch
- 10 Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die enzymatische Aktivität der abgeleiteten synthetisierten Proteine für das Einbringen eines oder mehrerer Gene in einen Organismus jedoch erhalten nicht wesentlich reduziert sein sollte. Die
- 15 Erfindung betrifft damit auch Aminosäuresequenzen, die durch die oben dargestellte Gruppe von Nukleinsäuresequenzen kodiert werden. Vorteilhaft betrifft die Erfindung Aminosäuresequenzen, die durch die Sequenz SEQ ID NO: 1 kodiert werden.
- 20 Weiterhin sind unter Homologe der SEQ ID NO: 1 beispielsweise pilzliche oder bakterielle Homologe, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA oder RNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz zu verstehen. Homologe der SEQ ID NO: 1 besitzen auf DNA-Ebene eine Homologie von mindestens 60 %, bevorzugt von
- 25 mindestens 70 %, besonders bevorzugt von mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt von mindestens 90 % über den gesamten in SEQ ID NO: 1 angegebenen DNA-Bereich.
- Außerdem sind unter Homologe der SEQ ID NO: 1 Derivate wie beispielsweise Promotorvarianten zu verstehen. Die Promotoren, die
- 30 den angegebenen Nukleotidsequenzen vorgeschaltet sind, können durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt sind.
- 35 Des weiteren können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden.
- Unter Derivaten sind auch Varianten zu verstehen, deren Nukleotidsequenz im Bereich von -1 bis -200 vor dem Startkodon oder
- 40 0 bis 1000 Basenpaare nach dem Stopkodon so verändert wurden, daß die Genexpression und/oder die Proteinexpression verändert, bevorzugt erhöht wird.
- 45 Vorteilhaft läßt sich die SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen aus Bakterien, bevorzugt aus gram-negativen Bakterien, besonders bevorzugt aus Bakterien der Gattung *Alcaligenes*, ganz besonders

bevorzugt aus Bakterien der Gattung und Art *Alcaligenes faecalis* über dem Fachmann bekannte Methoden isolieren.

- SEQ ID No: 1 oder seine Homologen oder Teile dieser Sequenzen  
5 lassen sich beispielsweise mit üblichen Hybridisierungsverfahren oder der PCR-Technik aus anderen Pilzen oder Bakterien isolieren. Diese DNA-Sequenzen hybridisieren unter Standardbedingungen mit den erfindungsgemäßen Sequenzen. Zur Hybridisierung werden vor-  
10 teilhaft kurze Oligonukleotide der konservierten Bereiche beispielsweise aus dem aktiven Zentrum, die über Vergleiche mit anderen Nitrilasen oder Nitrilhydratasen in dem Fachmann bekannter Weise ermittelt werden können, verwendet. Es können aber auch längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden.  
15 Je nach der verwendeten Nukleinsäure Oligonukleotid, längeres Fragment oder vollständige Sequenz oder je nachdem welche Nukleinsäureart DNA oder RNA für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca 10°C  
20 niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge.

- Unter Standardbedingungen sind beispielsweise je nach Nukleinsäure Temperaturen zwischen 42 und 58°C in einer wäßrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 X SSC  
25 = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50 % Formamid wie beispielsweise 42°C in 5 x SSC, 50 % Formamid zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20°C bis 45°C, bevorzugt zwischen etwa  
30 30°C bis 45°C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 30°C bis 55°C, bevorzugt zwischen etwa 45°C bis 55°C. Diese angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50 %  
35 in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik wie beispielsweise Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln beispielsweise abhängig von  
40 der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic  
45 Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular



Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

Unter dem erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukt sind die

5 Nitrilasegen Sequenz SEQ ID No. 1 und seine Homologen zu verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden

10 und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression

15 der Gene erhöht wurde. Das Nukleinsäurekonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Sequenz SEQ ID No. 1 oder seine Homologen inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, daß keine Regulation mehr erfolgt und die

20 Genexpression gesteigert wird. Das Nukleinsäurekonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche

25 vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können in einer oder mehreren Kopien im Konstrukt enthalten sein. Im Konstrukt können noch weitere Marker wie Antibiotikaresistenzen oder Auxotrophien komplementierende Gene

30 gegebenenfalls zur Selektion auf das Konstrukt enthalten sein.

Vorteilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacI<sup>q</sup>-, T7-, T5-, T3-, gal-,

35 trc-, ara-, SP6-,  $\lambda$ -P<sub>R</sub>- oder im  $\lambda$ -P<sub>L</sub>-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MF $\alpha$ , AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH.

40 In diesem Zusammenhang sind auch die Promotoren der Pyruvatdecarboxylase und der Methanoloxidase aus beispielsweise Hansenula vorteilhaft. Es können auch künstliche Promotoren für die Regulation verwendet werden.

45 Das Nukleinsäurekonstrukt wird zur Expression in einem Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen Vektor wie beispielsweise einem Plasmid, einem Phagen oder sonstiger DNA inseriert, das

eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Diese Vektoren stellen eine weitere Ausgestaltung der Erfindung dar. Geeignete Plasmide sind beispielsweise in *E. coli* pLG338, pA-CYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, 5 pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III<sup>113</sup>-B1,  $\lambda$ gt11 oder pBdCI, in *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in *Bacillus* pUB110, pC194 oder pBD214, in *Corynebacterium* pSA77 oder pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, in Hefen 2 $\mu$ M, pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLYe23 oder in Pflanzen pLGV23, pGHIac<sup>+</sup>, pBIN19, 10 pAK2004 oder pDH51. Die genannten Plasmide stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden.

15 Vorteilhafterweise enthält das Nukleinsäurekonstrukt zur Expression der weiteren enthaltenen Gene zusätzlich noch 3' und/oder 5' Terminale regulatorische Sequenzen zur Steigerung der Expression, die je nach ausgewähltem Wirtorganismus und 20 Gen oder Gene für eine optimale Expression ausgewählt werden.

Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst 25 nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene 30 erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise 35 die Stabilität der mRNA verbessert wird.

In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann der das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt oder die erfindungsgemäße Nukleinsäure enthaltende Vektor auch vorteilhafterweise in Form 40 einer linearen DNA in die Mikroorganismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Vektor wie einem Plasmid oder nur aus dem Nukleinsäurekonstrukt oder der Nukleinsäure bestehen.

45

Für eine optimale Expression heterologer Gene in Organismen ist es vorteilhaft die Nukleinsäuresequenzen entsprechend des im Organismus verwendeten spezifischen "codon usage" zu verändern. Der "codon usage" läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene des betreffenden Organismus leicht ermitteln.

Als Wirtsorganismen für die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder dem Nukleinsäurekonstrukt kommen prinzipiell alle prokaryontischen oder eukaryontischen Organismen in Frage. Vorteilhafterweise werden als Wirtsorganismen Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze oder Hefen verwendet. Vorteilhaft werden grampositive oder gram-negative Bakterien, bevorzugt Bakterien der Familie Enterobacteriaceae oder Nocardaceae, besonders bevorzugt Bakterien der Gattungen Escherichia, Pseudomonas oder Rhodococcus verwendet. Ganz besonders bevorzugt ist die Gattung und Art Escherichia coli.

Der Wirtsorganismus gemäß der Erfindung enthält dabei vorzugsweise mindestens ein proteinisches Agens zur Faltung der von ihm synthetisierten Polypeptide und insbesondere der in dieser Erfindung beschriebenen Nukleinsäuresequenzen mit Nitrilaseaktivität und/oder die dieses Agens codierenden Gene, wobei dieses Agens in einer Menge vorliegt, die größer ist als die, die der Grundmenge des betrachteten Mikroorganismus entspricht. Die für dieses Agens codierenden Gene sind im Chromosom oder in extrachromosomalen Elementen wie zum Beispiel Plasmiden enthalten.

### 30 Beispiele

Beispiel 1: Reinigung der Nitrilase aus *Alcaligenes faecalis* 1650

#### 1. Herstellung der Zellen

35 *Alcaligenes faecalis* 1650 wurde bei 30°C für die Dauer von 8 Stunden in Kulturmedium A unter Schütteln kultiviert.

Kulturmedium A:

40	Hefextrakt	5	g/l
	Pepton	3,5	g/l
	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> NH <sub>4</sub>	5	g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	g/l
	MgSO <sub>4</sub>	0,2	g/l
45	FeSO <sub>4</sub>	0,03	g/l
	NaCl	1	g/l
	Butyronitril	1	g/l

Mit 200 ml dieser Vorkultur wurde ein 10l-Fermenter mit 8l frischem Medium A beimpft. Der pH, die Temperatur, der Luftstrom und die Rührgeschwindigkeit lagen bei 7,2; 30°C, 300 l/h und 300 upm. Nach 22 Std. wurden 81 g Naßzellmasse gewonnen. Das entspricht einem Zelltrockengewicht von 3,8 g/l und einer optischen Dichte bei 600 nm von 8.

## 2. Bestimmung der enzymatischen Aktivität gegenüber Mandelonitril

10

Die Zellen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben gewonnen und in 10 mM Na/K-Phosphatpuffer, pH 7,2 zweimal gewaschen. 40 mg Zelltrockengewicht wurden in 20 ml 10 mM Na/K-Phosphatpuffer, pH 6,8, resuspendiert und die Reaktion durch Zugabe von 8,3 mM Mandelonitril gestartet. Die Reaktion wurde unter Schütteln bei 40°C durchgeführt. Die Kinetik der Racematspaltung wurde durch Probenentnahme und anschließender Zellabtrennung mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (ODS Hypersil) verfolgt. Dabei wurde Mandelonitril, Benzaldehyd, Mandelsäureamid und Mandelsäure bestimmt. Die Ergebnisse sind in Figur 1 [Umsetzung von Mandelonitril (= Mandelsäurenitril) zu Mandelsäure, Batch] dargestellt. Die Bildungsgeschwindigkeit von Mandelsäure beträgt 41,3 U/g Zelltrockengewicht bei einem Umsatz von 30 %, wobei 1U definiert ist als 1 µmol Mandelsäure, das pro Minute bei 40°C gebildet wird.

## 3. Bestimmung der enzymatischen Selektivität gegenüber Mandelonitril

Die Zellen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben gewonnen und in 10 mM Na/K-Phosphatpuffer, pH 7,2 zweimal gewaschen. 40 mg Zelltrockengewicht wurden in 20 ml 10 mM Na/K-Phosphatpuffer, pH 6,8, resuspendiert und die Reaktion durch Zugabe von 8,3 mM Mandelonitril gestartet. Die Reaktion wurde unter Schütteln bei 30°C durchgeführt. Die Kinetik wurde durch Probenentnahme und anschließende Zellabtrennung mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Nucleodex β-PM) verfolgt. Dabei wurde S-(+)- und R-(-)-Mandelsäure bestimmt. Die optische Reinheit der gebildeten R-(-)-Mandelsäure ( $ee_{R-MS}$ ) betrug 98% bei 50 % Umsatz.

Die Selektivität des Enzyms (= E) lag bei 50 % Umsatz bei 499.



#### 4. Reinigung

In allen Puffern war während der Reinigung -falls nicht anders angegeben- 10 mM DTT anwesend.

5

##### Schritt 1: Zellaufschluß

Die Zellen aus je zwei 10l-Fermentationen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben gewonnen, abzentrifugiert und zweimal mit 1 l 10 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,2 gewaschen. Die Ausbeute betrug ca. 162 g Zellfeuchtmasse. Je 81 g Zellfeuchtmasse wurden in 160 ml 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,2, resuspendiert und viermal in einem Menton-Gaulin bei 750 bar aufgeschlossen. Das Homogenat wurde dann für 30 min bei 30000 g zentrifugiert und das Pellet ver- 15 worfen. Der Überstand (140 ml) hatte eine Restaktivität von 73 % wie in Tab. 1 dargestellt.

##### Schritt 2: Ionenaustauschchromatographie

20 Der Überstand wurde mit Puffer A (20 mM Tris/HCl, pH 8,5) auf 400 ml verdünnt und nochmals bei 23000 g für 20 min zentrifugiert. 350 ml wurden dann auf eine Q-Sepharose Säule (Durchmesser 5 cm, Höhe 22 cm, Volumen 432 ml, Q-Sepharose Fast Flow von Pharmacia) in Puffer A aufgetragen. Bei einem Fluß von 20 ml/ 25 min wurde zunächst mit 10 % Puffer B (wie Puffer A mit 1 M NaCl) gewaschen (gesamtes Auftrags- und Waschvolumen entsprach 1,5 l). Im Verlauf von 90 min wurde linear das Verhältnis bis zu 60 % B gesteigert. Von 91 bis 120 min wurde dann mit 100 % Puffer B gewaschen. Es wurden 100 40ml-Fraktionen gesammelt. Die Nitrilase 30 eluierte zwischen den Fraktionen 50 und 60. Die Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration über eine 10 kDa Membran (Amicon) auf ein Volumen von 10 ml aufkonzentriert.

##### Schritt 3: Molekularsiebchromatographie

35

Das Konzentrat aus der Ionenaustauschchromatographie (Schritt 2) wurde in zwei Portionen zu je 5 ml durch Molekularsiebchromatographie (Superdex 200 prep. grade, Pharmacia, Trennbereich 10 bis 600 kDa, 2,6 cm Durchmesser, 60 cm Höhe, 325 ml Volumen) weiter 40 gereinigt. Die Detektion erfolgte bei 280 nm. Die Säule war in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, 5 mM DTT und 150 mM NaCl äquili- briert und wurde mit einem Fluß von 1,5 ml/min betrieben. Es wurden 40 Fraktionen gesammelt. Die Nitril-verseifende Aktivität befand sich in den Fraktionen 3 bis 5.

45

## Schritt 4: Ionenaustauschchromatographie

Die vereinigten Fraktionen aus der Molekularsiebchromatographie (Schritt 3) wurden durch Ionenaustauschchromatographie über eine Mono Q Säule (Säulenvolumen 1 ml, Mono Q HR515, Pharmacia) weiter gereinigt. Als Puffer A diene 20 mM Tris/HCl, pH 8,5, 5 mM DTT, als Puffer B der gleiche Puffer wie in A mit 1 M NaCl. Die Flußgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Die auf eine Leitfähigkeit von ca 6 mS/cm verdünnte Wertfraktion aus der Molekularsiebchromatographie (ca. 100 ml) wurde direkt auf die Mono Q Säule gegeben und das Protein so adsorbiert. Die Säule wurde nach dem Auftrag mit 5 % Puffer B gewaschen. Die Säule wurde in 30 min mit einem Gradienten von 5 % bis 40 % B eluiert, gefolgt von 100 % B für 10 Minuten. Die Elution der Nitrilase erfolgte in Fraktion 17 und 18 des Gradienten.

Die Schritte 1 - 4 der Reinigung werden in Tabelle I wiedergegeben.

20 Tabelle I: Reinigungsschema

	Probe	Vol. [ml]	Aktivität [U/l]	Gesamtaktivität [mU]	Ausbeute [%]	Protein [mg/ml]	Gesamtprotein [mg]	Spez. Aktivität [U/g]
25	vor Aufschluß	160	480	76800	100	-	-	-
30	nach Aufschluß	140	400	56000	72,9	-	-	-
	Q-Sepharose							
	Auftrag	140	192	26880	35	12,4	1736	15
	WF	400	77	30800	40,1	0,26	104	296
35	Superdex 200							
	Auftrag	9,5	>378	>3591	4,7	2,41	22,90	>157
	WF	43	59	2537	3,3	0,21	9,03	281
	MonoQ							
40	Auftrag	100	4,8	480	0,6	0,06	6,33	76
	WF	4	>77	308	0,4	0,19	0,76	>405

Die Wertfraktionen (= WF, Tabelle I) der Molekularsiebchromatographie (Schritt 3) und Ionenaustauschchromatographie über Mono Q (Schritt 4) sind über SDS-PAGE aufgetrennt worden wie in Figur 2 dargestellt.

## Schritt 5: Reversed-Phase (RP)-Hochflüssigkeitschromatographie

- Die Wertfraktion (Fraktion 17 und 18) der Mono Q Chromatographie (Schritt 4) wurde durch RP-Chromatographie auf Homogenität
- 5 überprüft und zur Vorbereitung einer Trypsinspaltung weiter gereinigt. Zur Trennung wurde eine Säule (3 cm) von Abimed an einem Hewlett-Packard Gerät (HP 1090) eingesetzt. Als Laufmittel diente Puffer A: Wasser mit 0,1 % TFA und Puffer B: Acetonitril mit 0,1 % TFA. Injektionsvolumen 0,1 ml, Flußgeschwindigkeit
- 10 0,5 ml/min. Der Elutionsgradient hatte folgenden Verlauf:

	Minute	% Puffer A	% Puffer B
	0	80	20
15	2	80	20
	22	30	70
	22,1	0	100
	24	0	100
	25	100	0
20	30	100	0

- Die Nitrilase eluierte zwischen 12 und 13 Minuten. Im SDS-PAGE entspricht das einer 37 kDa-Bande. Diese Bande wurde ansequen-
- 25 ziert. Es wurde der Sequenzer "494 Procise Protein Sequenzer" der Firma Applied Biosystems verwendet. Die so erhaltene N-terminale Sequenz von 39 Aminosäuren wird im Folgenden mit SEQ ID NO : 3 bezeichnet. Die Sequenz ist in der beigefügten Liste der Sequenzen aufgeführt und lautet: Met Gln Thr Arg Lys Ile Val Arg Ala
- 30 Ala Ala Val Gln Ala Ala Ser Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr Gly Val Asp Lys Thr Ile Glu Leu Ala Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly.

## Herstellung tryptischer Peptide

- 35 Die Probe aus der Mono Q Chromatographie (Schritt 4) wurde wie folgt vorbehandelt: das Protein (ca 0,6 mg) wurde durch 12,5 % TCA gefällt und das Pellet dreimal mit 1 ml Ether/Ethanol (1:1) gewaschen. Das Pellet wurde in 0,2 ml 6 M Guanidin HCl, 25 mM Tris/HCl, pH 8,5 gelöst. Zu dieser Lösung wurden 2,6 µl einer 1 M
- 40 DTT-Lösung zur Reduktion der Disulfidbrücken gegeben. Die Probe wurde eine Stunde in Dunkelheit geschüttelt. Danach wurde das Protein mit 1,5 µl einer 4-Vinylpyridinlösung (35 %) für 2 Stunden in Dunkelheit umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Inkubation für 1 Stunde mit 2,6 µl einer 1 M DTT-Lösung beendet. Das vinyl-
- 45 pyrrolidierte Enzym wurde wie oben beschrieben durch RP-HPLC gereinigt. Die Retentionszeit betrug nun zwischen 10 und 11 Minuten. Die Wertfraktion, identifiziert durch ihr Molekular-

gewicht, wurde gesammelt und auf 0,02 ml aufkonzentriert. Dazu wurden 0,01 ml Acetonitril und 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5 ad 0,2 ml gegeben. Zur Korrektur des pH-Wertes wurden noch ca. 0,05 ml 0,1 M NaOH zugesetzt. Die Probe (0,3 mg geschätzte Proteinmenge) wurde mit 0,032 ml einer 1 mg/ml Trypsinlösung in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5, 5 % Acetonitril, versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde mit 0,01 ml Essigsäure gestoppt und dann zentrifugiert. Der Überstand wurde durch RP-HPLC auf C18 getrennt. (Laufsystem: Puffer A: Wasser, 0,1 % TFA, Puffer B: Acetonitril, 0,1 % TFA). Peptide (Detektion 205 nm und 280 nm) wurden gesammelt und sequenziert. Es wurde der Sequenzer "494 Procise Protein Sequenzer" der Firma Applied Biosystems verwendet. Die interne Peptidsequenz von 21 Aminosäuren wird im folgenden mit SEQ ID NO : 4, die interne Peptidsequenz von 11 Aminosäuren mit SEQ ID NO : 5 bezeichnet. SEQ ID NO : 4 und 5 sind in der beigefügten Liste der Sequenzen aufgeführt und lauten:

SEQ ID NO : 4

20 Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys Ile Ala Ser Val Ala  
Ile Ser His Pro Gln

SEQ ID NO : 5

Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys

25

6. Aktivität der gereinigten Nitrilase gegenüber Mandelonitril

Die Aktivität der gereinigten Nitrilase gegenüber Mandelonitril wurde wie in Beispiel 2 beschrieben untersucht. Die spezifische

30 Aktivität des gereinigten Proteins gegenüber Mandelonitril lag bei 12380 U/g Protein.

Beispiel 2: Klonierung der Nitrilase aus *Alcaligenes faecalis*  
1650

35

Aus den in Beispiel 1 dargestellten Peptidsequenzen SEQ ID NO : 3 und 4 wurden Nukleotidsonden abgeleitet und synthetisiert. Von der SEQ ID NO : 3, der N-terminalen Peptidsequenz, war die abgeleitete Nukleotidsonde ein 23 mer, 64 mal degeneriert (in der

40 Sequenz der Nukleotidsonde wird A, C, G oder T durch N ersetzt; A oder G durch R; C oder G durch S). Durch den hohen Prozentanteil an GC der in der Literatur beschriebenen Stämme *Alcaligenes* (Wada et al., 1992, Nucl. Acids Res., 20, 2111-2118) waren im Falle des Glutamins und des Isoleucins die Auswahl der dritten

45 Position des Codons vorgegeben. Die Nukleotidsonde, die im Folgenden mit SEQ ID NO : 6 bezeichnet wird, stellt den 5'-Primer

für die nachfolgende PCR dar, wobei S = C oder G und N = A, C, G oder T bedeutet, und lautet:

SEQ ID NO : 6

5 5'-ATGCAGACNAGNAARATCGTSCG-3'

Von SEQ ID NO : 4, der internen Peptidsequenz, wurde ein 20 mer als Nukleotidsonde abgeleitet, 256 mal degeneriert (in der Sequenz der Nukleotidbasen wird A, C, G oder T durch N ersetzt; 10 A oder G durch R; C oder G durch S). Durch den hohen Prozentanteil an GC der Stämme *Alcaligenes* war im Falle des Lysins die Auswahl der dritten Position des Codons vorgegeben. Diese Nukleotidsonde stellt den 3'-Primer für die nachfolgende PCR dar und wird im Folgenden mit SEQ ID NO : 7 bezeichnet. Sie ist 15 in der beigefügten Liste der Sequenzen aufgeführt und lautet:

SEQ ID NO : 7

5'-TNGCSACNGANGCRATCTTG-3'

20 Mit Hilfe dieses Primerpaars, SEQ ID NO : 6 und 7, wurde die PCR an chromosomaler DNA aus *Alcaligenes faecalis* 1650 durchgeführt. Die Isolierung chromosomaler DNA erfolgte nach Zelllyse mit Lysozym und Proteinase K-Behandlung nach der dem Fachmann bekannten klassischen Methode (Ausubel, F. M. et al. (1994) Current 25 protocols in molecular biology, John Wiley and Sons).

Unter Verwendung der Pwo-Polymerase beinhaltete die PCR eine Denaturierung für 3 min bei 95°C; 35 Zyklen mit einer Denaturierung für 1 min bei 95°C, einer Primeranlagerung für 1 min 30 sec bei 30 58°C und eine Polymerisation für 1 min 30 sec bei 72°C; und einer Abschlußpolymerisation für 5 min bei 72°C.

Unter diesen Bedingungen wurde aus der chromosomalen DNA aus *Alcaligenes faecalis* 1650 ein etwa 1 kb großes Fragment amplifiziert. Zur Klonierung des PCR-Produktes wurde an die bereits 35 erwähnten Primer je eine XbaI-Restriktions-schnittstelle und zwei zusätzliche Nukleotide angehängt (5'-AATCTAGA bzw. 5'-ATTCTAGA) und die PCR-Reaktion unter den oben genannten Bedingungen wiederholt. Erneut wurde ein etwa 1 kb-großes Fragment amplifiziert, 40 das nach Reinigung und XbaI-Verdau in analog verdauten pUC18 ligiert wurde. Nach Transformation von *E. coli* JM109 und Isolierung des resultierenden Plasmids wurde die DNA durch Sequenzierung und anschließenden genomischen Southern Blot verifiziert. Die molekularbiologischen und mikrobiologischen 45 Methoden zur Isolierung des kompletten Nitrilase-Gens (*nit*)



erfolgte nach den dem Fachmann bekannten klassischen Methoden.  
Die komplette Nitrilase-Sequenz ist in SEQ ID NO: 1 dargestellt.

Beispiel 3: Homologie mit anderen Proteinen, Identifizierung  
5 der homologen Sequenz

Der Vergleich mit Sequenzen aus der Proteindatenbank SWISSPROT zeigte, daß das Nitrilasegen in dieser Erfindung 11 bis 96 % Homologie zu bekannten Nitrilasen auf Aminosäureebene besitzt.

- 10 Die höchste Sequenzhomologie wurde zu der Arylacetonitril-spezifischen Nitrilase aus *Alcalignes faecalis* JM3 (Nagasawa et al., Eur. J. Biochem. 1990, 194, 765-772) gefunden. Die beiden Nitrilasegene weisen eine Identität von 93,2 % auf Nukleotidebene über einen Bereich von 1071 bp auf. Die abgeleitete Aminosäure-
- 15 sequenz weist eine Identität von 96,1 % über einen Bereich von 356 Aminosäuren auf. Die geringste Homologie von 11,4 % über einen Bereich von 534 Aminosäuren wurde zu der Nitrilase aus *Rhodococcus erythropolis* SK92 (EP-A-0 719 862) gefunden.

20 Beispiel 4: Heterologe Expression der Nitrilase in *E. coli*

Zur Klonierung in den Expressionsvektor pJOE2702 wurde das nit-Gen amplifiziert. Dabei wurde als 5'-Primer für die PCR die o.g. SEQ ID NO : 3 ausgewählt, wobei an das 5'-nit-Ende eine mit dem

- 25 Translationsstart überlappende NdeI-Schnittstelle angefügt wurde. Dieser Primer wird im Folgenden als SEQ ID NO : 8 bezeichnet und ist in der beigefügten Liste der Sequenzen aufgeführt. Als 3'-Primer wurde ein 24 mer aus dem 3'-Bereich des nit-Gens ausgewählt, bei dem eine an das Stopcodon angrenzende BamHI-Schnitt-
- 30 stellen angefügt wurde. Er wird im Folgenden als SEQ ID NO : 9 bezeichnet und ist in der nachfolgenden Liste der Sequenzen aufgeführt.

5'-TTAATCATATGCAGACAAGAAAAATCGTCCG-3' (= SEQ ID NO: 8)

- 35 5'-AAGGATCCTCAAGACGGCTCTTGCACTAGCAG-3' (= SEQ ID NO : 9)

Unter Verwendung der Pwo-Polymerase beinhaltete die PCR eine Denaturierung für 3 min bei 94°C; 25 Zyklen mit einer Denaturierung für 1 min bei 93°C, einer Primeranlagerung für 1 min 30 sec bei

- 40 55°C und einer Polymerisation für 1 min 30 sec bei 72°C bzw. einer Abschlußpolymerisation für 5 min bei 72°C. Das erhaltene PCR-Fragment wurde gereinigt, mit NdeI/BamHI verdaut und in analog verdauten Vektor pJOE2702 (Volff et al., 1996, Mol. Microbiol., 21(5), 1037-1047) integriert. Das resultierende Plasmid wurde mit
- 45 pDHE 19.2 bezeichnet und ist in Figur 3 dargestellt. Durch die Integration über die NdeI/BamHI-Schnittstellen steht das nit-Gen in dem Plasmid pDHE19.2 unter Transkriptionskontrolle des in

pJOE2702 enthaltenen Promotors *rhaP*, der aus dem positiv regulierten L-Rhamnose-Operon *rhaBAD* in *E. coli* (Egan & Schleif, 1994, J.Mol. Biol., 243, 821-829) stammt. Die Transkriptionstermination des *nit*-Gens und die Translationsinitiation erfolgen ebenfalls  
5 über Vektorsequenzen. Daneben enthält das Plasmid noch ein Gen, das die Ampicillin-Resistenz  $Ap^R$  verleiht.

Die heterologe Expression der Nitrilase wurde bei dem das Plasmid pDHE19.2 enthaltenden Stamm *E. coli* JM109 gezeigt. Zu diesem  
10 Zweck wurde der Stamm JM109 (pDHE19.2) im Kulturmedium TB bei 37°C mit 100 µg/ml Ampicillin (Tartof, Hobbs 1987) unter Schütteln angezogen. Bei einer  $OD_{600}$  von 1,7 wurde die Kultur 1:200 in frisches TB-Medium, das zur Induktion der Nitrilase 0,2 % (w/v) L-Rhamnose enthielt, überimpft und bei 30°C unter Schütteln kultiviert.  
15 Nach 8 Stunden wurden die Zellen geerntet, mit 10 mM Na/K-Phosphatpuffer, pH 7,2, gewaschen, in demselben Puffer entsprechend einer  $OD_{600}$  von 10 resuspendiert und nach Ultraschallbehandlung aufgeschlossen.

20 Beispiel 5: Bestimmung der Nitrilase-Aktivität des rekombinaten Stamms *E. coli* JM109 (pDHE19.2)

#### 1. Herstellung der Zellen

25 *E. coli* JM109 (pDHE19.2) wurde bei 37°C für die Dauer von 6 Stunden in TB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin unter Schütteln kultiviert. Bei einer  $OD_{600}$  von 4 wurde mit 100 ml dieser Vor- kultur ein 10l-Fermenter mit 8l frischem TB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin + 2 g/l L-Rhamnose beimpft. Der pH, die Temperatur,  
30 der Luftstrom und die Rührgeschwindigkeit lagen bei 7,2, 30°C, 300 l/h und 400-650 upm. Nach 16 Stunden wurden die Zellen geerntet. Zu diesem Zeitpunkt betrug die optische Dichte bei 600 nm 18, was einem Zelltrockengewicht von 7,8 g/l entsprach.

#### 35 2. Bestimmung der spezifischen Aktivität gegenüber Mandelonitril

Die Zellen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben gewonnen und in 10 mM Na/K-Phosphatpuffer, pH 7,2 gewaschen. 2 mg Zelltrockengewicht wurden in 1 ml 10 mM Na/K-Phosphatpuffer, pH 7,2, re-  
40 suspendiert und die Reaktion durch Zugabe von 8,3 mM Mandelonitril gestartet. Die Reaktion wurde unter Schütteln bei 40°C durchgeführt. Die Kinetik wurde über Probenentnahme und anschließende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (ODS Hypersil) verfolgt. Dabei wurde Mandelonitril, Benzaldehyd, Mandelsäureamid  
45 und Mandelsäure bestimmt. Die Bildungsgeschwindigkeit von Mandelsäure beträgt 403 U/g Zelltrockengewicht bei einem Umsatz von

30 %, wobei 1U definiert ist als 1  $\mu$ mol Mandelsäure, das pro Minute bei 40°C gebildet wird.

- 5 Beispiel 6: Synthese von R-Mandelsäure über Verseifung von Mandelonitril mit Hilfe von E. coli JM109 (pDHE19.2) in Suspension

10 In einem Volumen von 1l 10 mM Na/K-Phosphatpuffer, pH 7,2, der den Stamm E. coli JM109 (pDHE19.2) in einer Konzentration von 2 g/l enthielt, wurde bei 40°C unter Rühren mit einem Blattrührer über 10 Stunden Mandelonitril in einer Konzentration von 1,3 g/l zudosiert. Die Dosierung wurde über den Nitril-Verbrauch reguliert. Die Bildungsgeschwindigkeit von R-Mandelsäure wurde wie in Beispiel 5 beschrieben verfolgt. Die Ergebnisse sind in Figur 4 15 dargestellt.

- 20 Beispiel 7: Gewinnung von R-Mandelsäure über Extraktion aus dem Reaktionsansatz der Mandelonitril-Verseifung durch E. Coli JM109 (pDHE19.2) in Suspension

Der in Beispiel 6 erhaltene, wässrige Reaktionsansatz an Mandelsäure wurde von den Zellen über Zentrifugation befreit, mit einer Säure auf pH 2 gestellt und dreimal mit Methyltertiärbutylether (MTBE) extrahiert. Nach Abdampfen des organischen Lösungsmittels 25 des Mandelsäureextraktes wurden die so erhaltenen, weißen Mandelsäurekristalle rückgelöst und auf chemische und optische Reinheit über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie untersucht. Die chemische Reinheit lag bei 99 %, die optische Reinheit der R-Mandelsäure bei 97,4 % ee.

- 30 Beispiel 8: Gewinnung von R-Mandelsäure über Kühlungs-Kristallisation aus dem Reaktionsansatz der Mandelonitril-Verseifung durch E. coli JM109 (pDHE19.2) in Suspension

35 Der in Beispiel 6 erhaltene, wässrige Reaktionsansatz an Mandelsäure wurde von den Zellen über Zentrifugation befreit, unter Erwärmung und Rührung auf 40 % des Ausgangsvolumens aufkonzentriert und mit einer Säure auf pH 2 gestellt. Durch Abkühlung im Eisbad wurde die Mandelsäure auskristallisiert und die so erhaltenen, 40 weißen Mandelsäurekristalle über eine Nutsche abgesaugt und getrocknet. Die Kristalle wurden rückgelöst und über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie auf chemische und optische Reinheit untersucht. Die chemische Reinheit lag bei 99,1 %, die optische Reinheit der R-Mandelsäure lag bei 99,8 % ee.



## Beispiel 9: Umsetzung verschiedener Nitrile

Mit dem E. coli Stamm (siehe Beispiel 6) oder mit dem Ausgangs-  
stamm Alcaligenes wurden verschieden Nitrile umgesetzt. Die  
5 Alcaligenes-Zellen wurden in 400 ml Alcaligenes-Medium (siehe  
oben Medium A) bei 30°C und 160 Upm für 16 Stunden (= h) ange-  
zogen. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (30 min, 4°C  
und 5000 Upm). Je 150 µl einer Zellsuspension wurden pro Well  
in eine Mikrotiterplatte pipetiert. Die Platte wurde anschließend  
10 zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellpellets  
zweimal mit Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,42 g/l in Finnaqua, pH 7,2) gewaschen. An-  
schließend wurde die Substratlösung (150 µl) zupipettiert und die  
Zellen erneut resuspendiert. Je eine 12-er Reihe der Mikrotiter-  
platte wurde mit einem Substrat versetzt. Als Kontrolle wurde  
15 eine Reihe mit der Substratlösung ohne Zellen genommen (= Leer-  
wert).

Die Mikrotiterplatten wurden bei 30°C und 200 Upm für 2 Stunden  
im Schüttelinkubator belassen. Danach wurden die Zellen abzentri-  
20 fugiert und im Überstand die entstandene Menge an NH<sub>4</sub>-Ionen mit  
Hilfe der Biomek-Geräts bestimmt. Die Messung erfolgte bei 620 nm  
gegen eine Eichkurve, die mit verschiedenen NH<sub>4</sub>OH-Lösungen er-  
stellt wurden war (siehe Figur 5). Als Substrate wurden Mandelo-  
nitril (= 1), 2-Phenylpropionitril (= 2), 2-Phenylbutyronitril  
25 (= 3), Benzylcyanid (= 4), 4-Chlorbenzylcyanid (= 5), 4-Brom-  
benzylcyanid (= 6), Propionitril (= 7), 2-Methylbutyronitril  
(= 8, 2-Cyanobutan), Geranonitril (= 9), Valeronitril (= 10),  
3-Cyanpyridin (= 11), 3-Biphenyl-2-hydroxy-butyronitril (= 12),  
4-Flourbenzylcyanid (= 13, 4-Fluorophenylacetronitril) und  
30 α-(3-Heptyl)-nitro-triacetonitril (= 14) verwendet. Die Substrate  
wurden 0,2 molar in Methanol angesetzt und von dieser Stammlösung  
ausgehend mit Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,42 g/l in Finnaqua, pH 7,2) auf 10 mM  
verdünnt. Die Zellsuspensionen wurden auf 2 g/l Biotrockenmasse  
standardisiert. Tabelle II gibt die Mittelwerte einer Mikrotiter-  
35 plattenreihe bei der Umsetzung wieder.

Tabelle II: Umsetzung verschiedener Nitrile mit Nitrilase 1650

	Substrat-Nr.	$\mu\text{mol/l}$	Aktivität	% Umsatz
5	1	2141,2	8,9	86,3
	2	1001,1	4,1	70,2
	3	24,4	0,1	44,3
	4	2210,5	9,2	100
10	5	2136,3	8,9	100
	6	1500,8	6,2	100
	7	4,9	0,02	NA
	8	-	-	NA
15	9	-	-	NA
	10	113,4	0,47	NA
	11	-	-	NA
	12	-	-	NA
20	13	2222,9	9,2	100
	14	84,8	0,35	44,1

Figur 6 gibt die Ergebnisse der Umsetzung als Aktivitätswerte wieder.

25

30

35

40

45

## Patentansprüche

1. Isolierte Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit  
5 Nitrilaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:
  - a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,
  - 10 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten,
  - 15 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 95 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.
- 20 2. Aminosäuresequenz codiert durch eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1.
3. Aminosäuresequenz nach Anspruch 2, codiert durch die in  
25 SEQ ID NO: 1 dargestellte Sequenz.
4. Nukleinsäurekonstrukt enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1, wobei die Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen verknüpft ist.
- 30 5. Vector enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4.
6. Mikroorganismus enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4.
- 35 7. Mikroorganismus nach Anspruch 6, wobei es sich bei dem Mikroorganismus um ein Bakterium der Gattungen Escherichia, Pseudomonas oder Alcaligenes handelt.
- 40

8. Verfahren zur Herstellung von chiralen Carbonsäuren der allgemeinen Formel I

5



10

dadurch gekennzeichnet, daß man racemische Nitrile der allgemeinen Formel II

15



20

in Gegenwart einer Aminosäuresequenz gemäß Anspruch 2 oder 3 oder einem wachsenden, ruhenden oder aufgeschlossenen Mikroorganismus gemäß Anspruch 6 oder 7 umgesetzt und wobei mindestens 25 mmol Nitril/h pro mg Protein oder 25 mmol Nitril/h pro g Trockengewicht zu den chiralen Carbonsäuren umgesetzt werden,

25

wobei die Substituenten und Variablen in den Formeln I und II folgende Bedeutung haben:

\* ein optisch aktives Zentrum

30

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  unabhängig voneinander Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes  $C_1$ - $C_{10}$ -Alkyl-,  $C_2$ - $C_{10}$ -Alkenyl-, substituiertes oder unsubstituiertes Aryl-, Hetaryl-,  $OR^4$  oder  $NR^4R^5$  und wobei die Reste  $R^1$ ,  $R^2$  und  $R^3$  immer unterschiedlich sind,

35

$R^4$  Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes  $C_1$ - $C_{10}$ -Alkyl-,  $C_2$ - $C_{10}$ -Alkenyl-,  $C_1$ - $C_{10}$ -Alkylcarbonyl-,  $C_2$ - $C_{10}$ -Alkenylcarbonyl-, Aryl-, Arylcarbonyl-, Hetaryl- oder Hetarylcarbonyl-,

40

$R^5$  Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes  $C_1$ - $C_{10}$ -Alkyl-,  $C_2$ - $C_{10}$ -Alkenyl-, Aryl- oder Hetaryl-.

- 45 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß einer der Substituenten  $R^1$ ,  $R^2$  oder  $R^3$   $OR^4$  bedeutet.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet,  
daß einer der Substituenten  $R^1$ ,  $R^2$  oder  $R^3$  Aryl- bedeutet.
- 5 11. Verfahren nach den Ansprüchen 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren in wäßriger Reaktionslösung bei einem pH zwischen 4 bis 11 durchgeführt wird.
- 10 12. Verfahren nach den Ansprüchen 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß im Verfahren 0,01 bis 10 Gew.-% Nitril oder 0,01 bis 10 Gew.-% eines entsprechenden Aldehyds oder Ketons und 0,01 bis 10 Gew.-% Blausäure umgesetzt werden.
- 15 13. Verfahren nach den Ansprüchen 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren bei einer Temperatur zwischen 0°C bis 80°C durchgeführt wird.
- 20 14. Verfahren nach den Ansprüchen 8 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die chirale Carbonsäure über Extraktion oder Kristallisation oder Extraktion und Kristallisation in Ausbeuten von 60 bis 100 % aus der Reaktionslösung gewonnen wird.
- 25 15. Verfahren nach den Ansprüchen 8 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die chirale Carbonsäure eine optische Reinheit von mindestens 90 %ee besitzt.

30

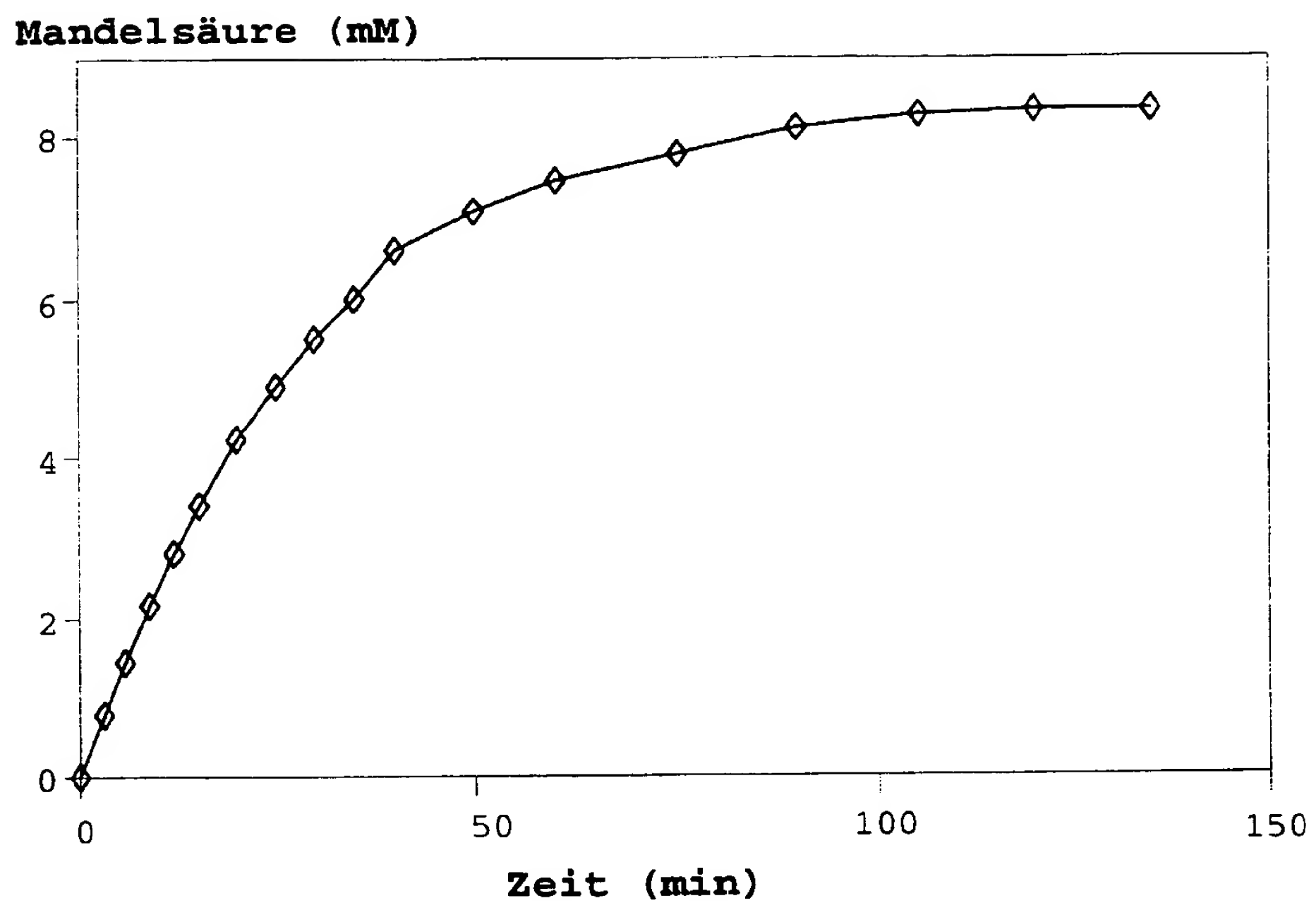
35

40

45



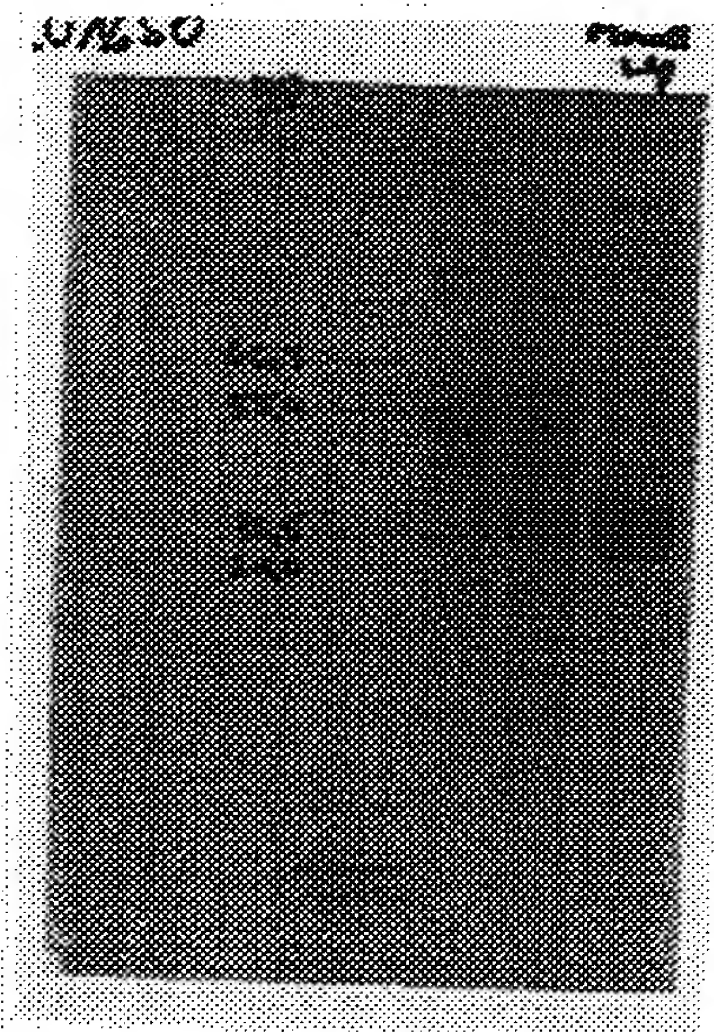
Figur 1





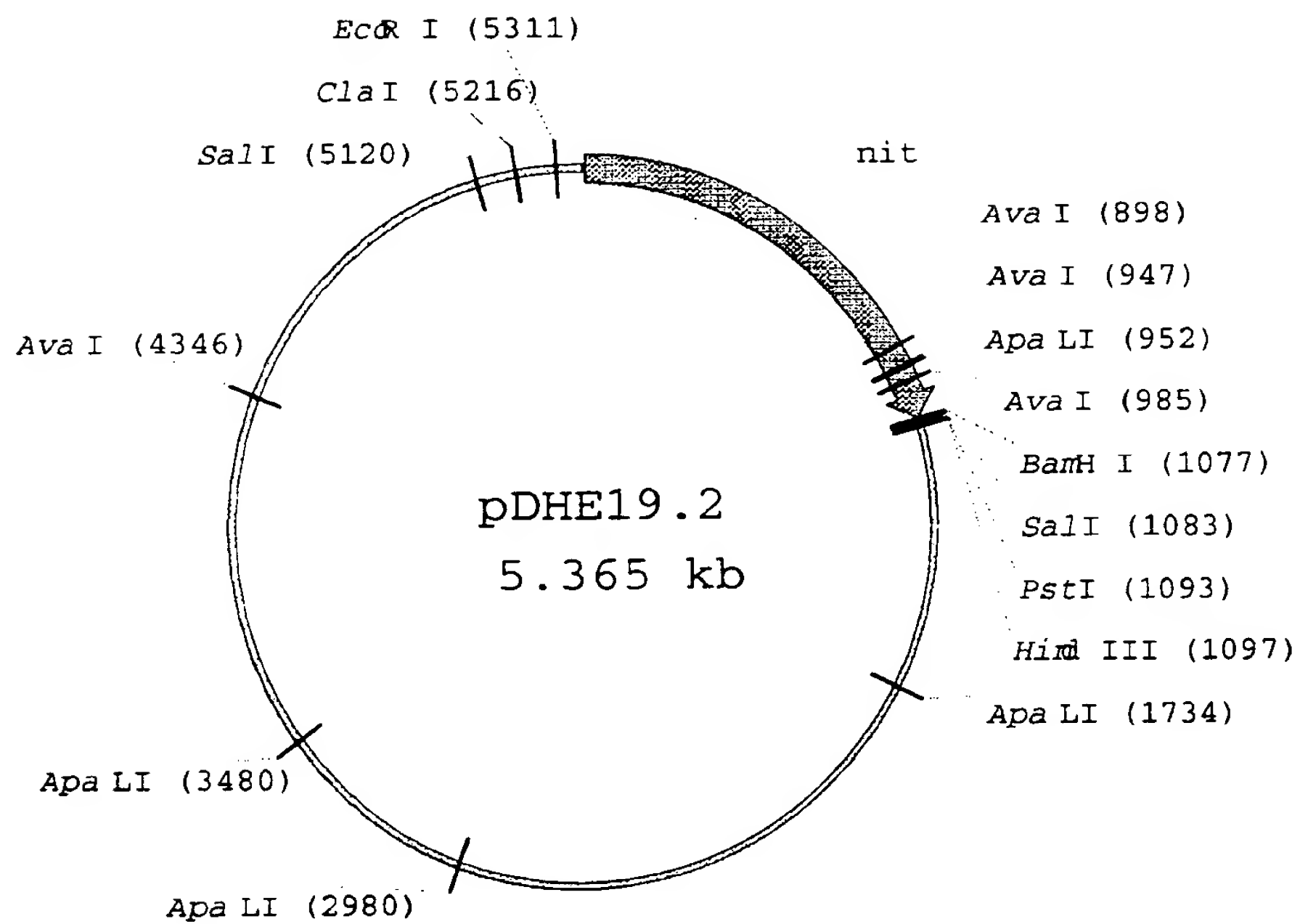


Figur 2

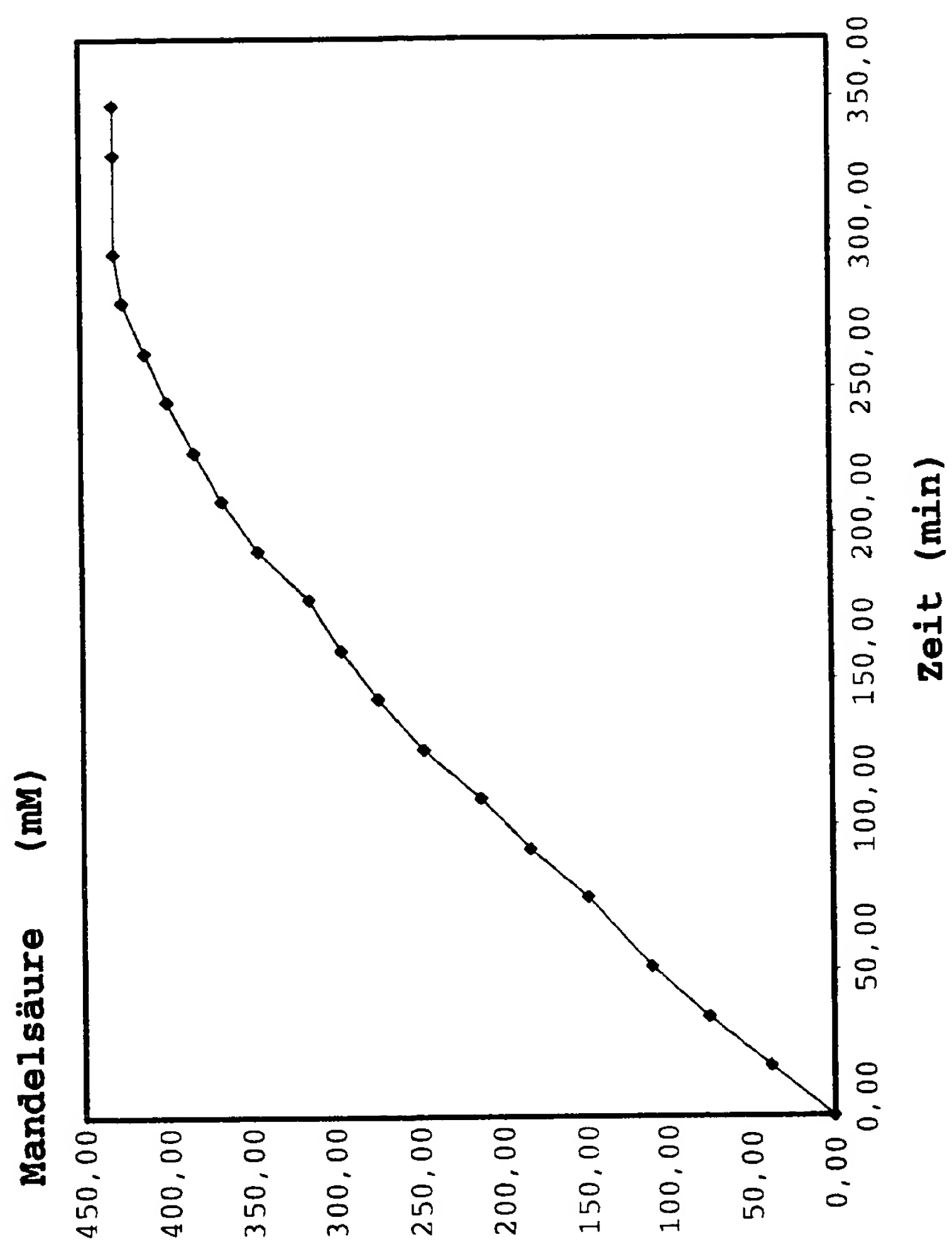




Figur 3



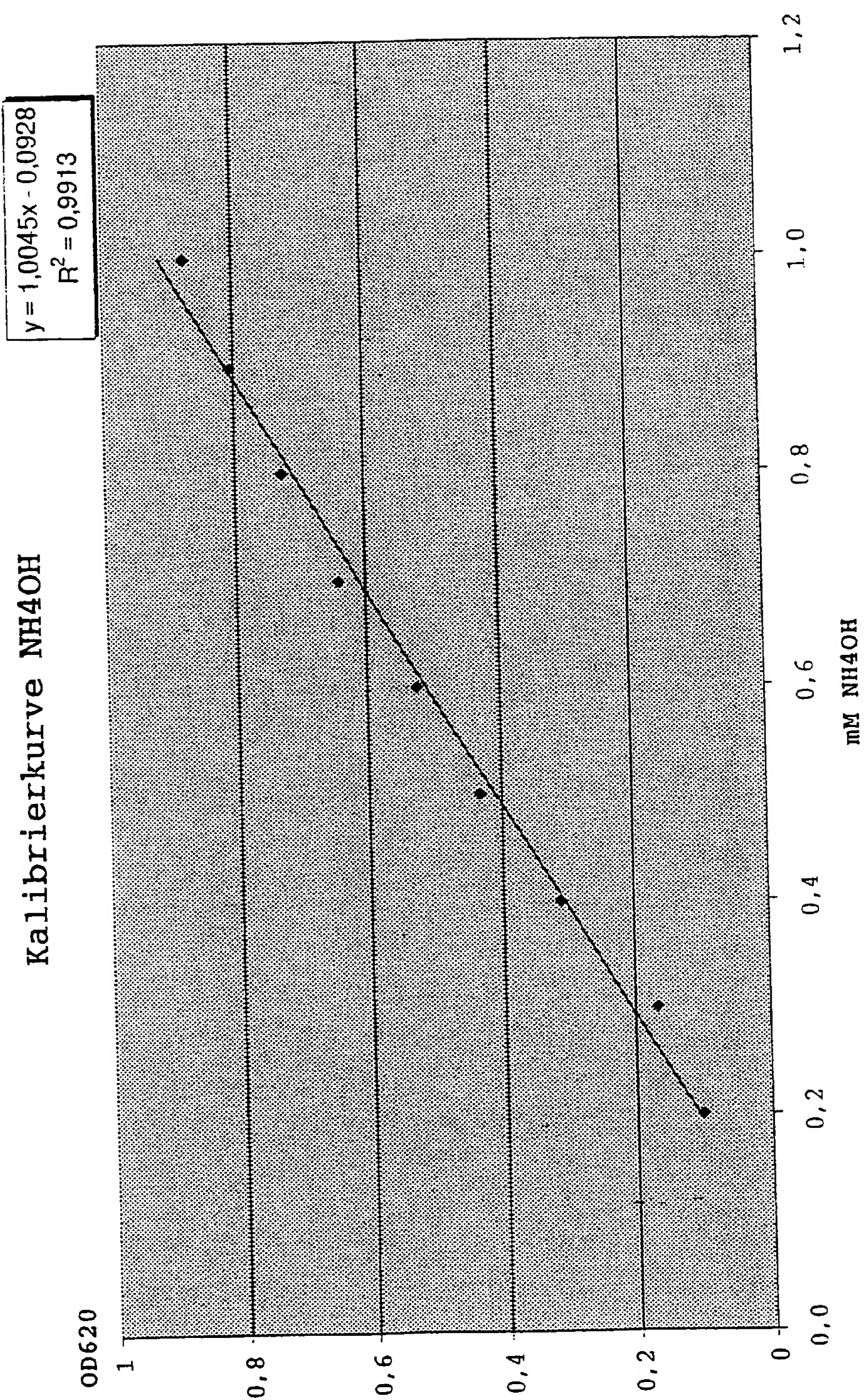




Figur 4



Figur 5

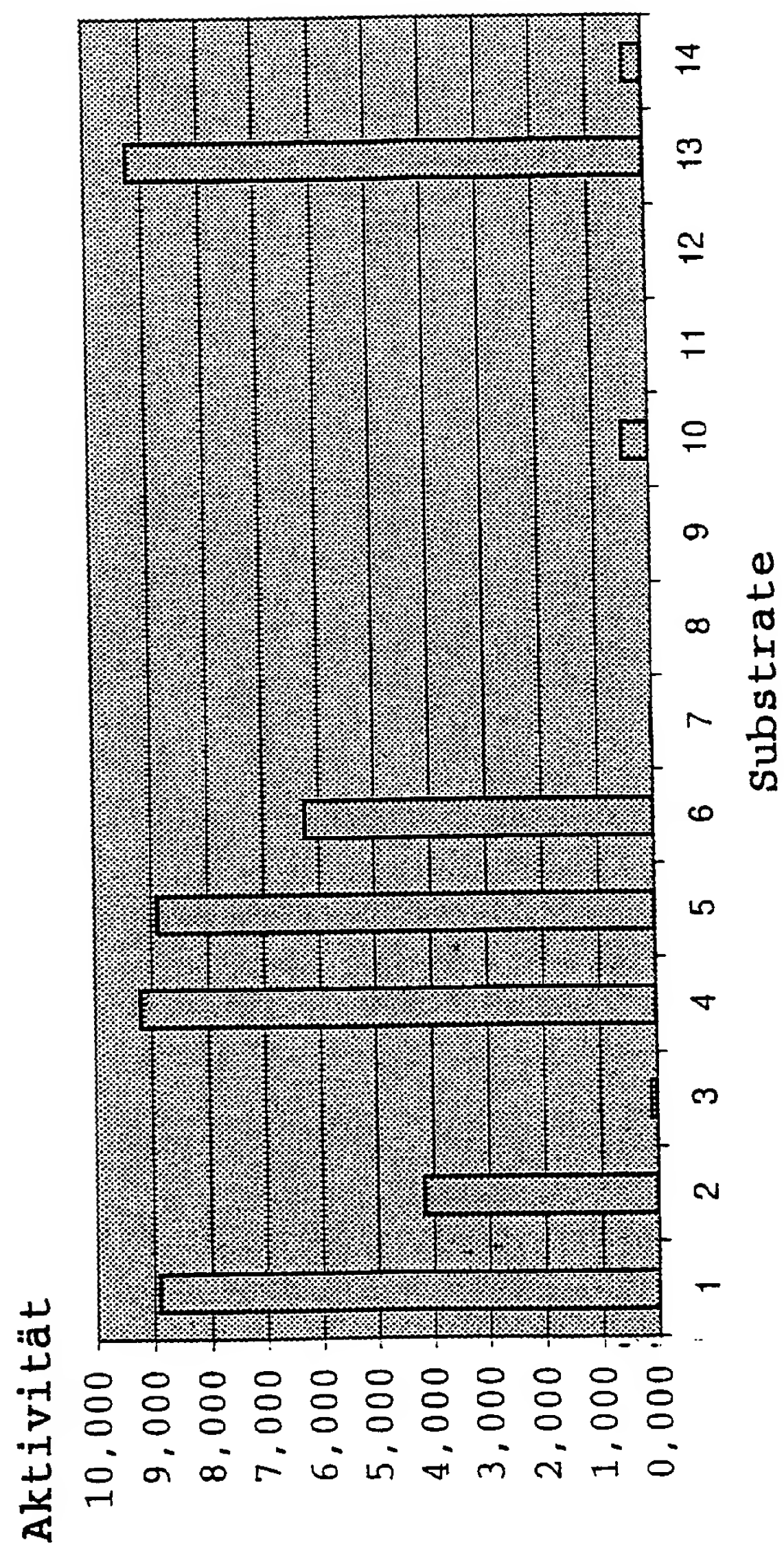






Figur 6

## Substratspezifitäten der Nitrilase 1650





## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALGEMEINE INFORMATION:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Carl-Bosch-Strasse 38
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (D) BUNDESLAND: Rheinland-Pfalz
- (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-67056

- (ii) ANMELDETITEL: Verfahren zur Herstellung chiraler Carbonsaeuren aus Nitrilen mit Hilfe einer Nitrilase oder Mikroorganismen, die ein Gen fuer die Nitrilase enthalten

- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 9

## (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1071 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

- (iii) ANTISENSE: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Alcaligenes faecalis
- (B) STAMM: 1650

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..1071

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATG CAG ACA AGA AAA ATC GTC CGG GCA GCC GCC GTA CAG GCC GCC TCT  
Met Gln Thr Arg Lys Ile Val Arg Ala Ala Ala Val Gln Ala Ala Ser  
1 5 10 15



CCC AAC TAC GAT CTG GCA ACG GGT GTT GAT AAA ACC ATT GAG CTG GCT	96
Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr Gly Val Asp Lys Thr Ile Glu Leu Ala	
20 25 30	
CGT CAG GCC CGC GAT GAG GGC TGT GAC CTG ATC GTG TTT GGT GAA ACC	144
Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly Cys Asp Leu Ile Val Phe Gly Glu Thr	
35 40 45	
TGG CTG CCC GGA TAT CCC TTC CAC GTC TGG CTG GGC GCA CCG GCC TGG	192
Trp Leu Pro Gly Tyr Pro Phe His Val Trp Leu Gly Ala Pro Ala Trp	
50 55 60	
TCG CTG AAA TAC AGT GCC CGC TAC TAT GCC AAC TCG CTC TCG CTG GAC	240
Ser Leu Lys Tyr Ser Ala Arg Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Ser Leu Asp	
65 70 75 80	
AGT GCA GAG TTT CAA CGC ATT GCC CAG GCC GCA CGG ACC TTG GGT ATT	288
Ser Ala Glu Phe Gln Arg Ile Ala Gln Ala Ala Arg Thr Leu Gly Ile	
85 90 95	
TTC ATC GCA CTG GGT TAT AGC GAG CGC AGC GGC GGC AGC CTT TAC CTG	336
Phe Ile Ala Leu Gly Tyr Ser Glu Arg Ser Gly Gly Ser Leu Tyr Leu	
100 105 110	
GGC CAA TGC CTG ATC GAC GAC AAG GGC GAG ATG CTG TGG TCG CGT CGC	384
Gly Gln Cys Leu Ile Asp Asp Lys Gly Glu Met Leu Trp Ser Arg Arg	
115 120 125	
AAA CTC AAA CCC ACG CAT GTA GAG CGC ACC GTA TTT GGT GAA GGT TAT	432
Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Val Phe Gly Glu Gly Tyr	
130 135 140	
GCC CGT GAT CTG ATT GTG TCC GAC ACA GAA CTG GGA CGC GTC GGT GCT	480
Ala Arg Asp Leu Ile Val Ser Asp Thr Glu Leu Gly Arg Val Gly Ala	
145 150 155 160	
CTA TGC TGC TGG GAG CAT TTG TCG CCC TTG AGC AAG TAC GCG CTG TAC	528
Leu Cys Cys Trp Glu His Leu Ser Pro Leu Ser Lys Tyr Ala Leu Tyr	
165 170 175	
TCC CAG CAT GAA GCC ATT CAC ATT GCT GCC TGG CCG TCG TTT TCG CTA	576
Ser Gln His Glu Ala Ile His Ile Ala Ala Trp Pro Ser Phe Ser Leu	
180 185 190	
TAC AGC GAA CAG GCC CAC GCC CTC AGT GCC AAG GTG AAC ATG GCT GCC	624
Tyr Ser Glu Gln Ala His Ala Leu Ser Ala Lys Val Asn Met Ala Ala	
195 200 205	
TCG CAA ATC TAT TCG GTT GAA GGC CAG TGC TTT ACC ATC GCC GCC AGC	672
Ser Gln Ile Tyr Ser Val Glu Gly Gln Cys Phe Thr Ile Ala Ala Ser	
210 215 220	



3

AGT GTG GTC ACC CAA GAG ACG CTA GAC ATG CTG GAA GTG GGT GAA CAC	720
Ser Val Val Thr Gln Glu Thr Leu Asp Met Leu Glu Val Gly Glu His	
225 230 235 240	
AAC GCC CCC TTG CTG AAA GTG GGC GGC GGC AGT TCC ATG ATT TTT GCG	768
Asn Ala Pro Leu Leu Lys Val Gly Gly Gly Ser Ser Met Ile Phe Ala	
245 250 255	
CCG GAC GGA CGC ACA CTG GCT CCC TAC CTG CCT CAC GAT GCC GAG GGC	816
Pro Asp Gly Arg Thr Leu Ala Pro Tyr Leu Pro His Asp Ala Glu Gly	
260 265 270	
TTG ATC ATT GCC GAT CTG AAT ATG GAG GAG ATT GCC TTC GCC AAA GCG	864
Leu Ile Ile Ala Asp Leu Asn Met Glu Glu Ile Ala Phe Ala Lys Ala	
275 280 285	
ATC AAT GAC CCC GTA GGC CAC TAT TCC AAA CCC GAG GCC ACC CGT CTG	912
Ile Asn Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Lys Pro Glu Ala Thr Arg Leu	
290 295 300	
GTG CTG GAC TTG GGG CAC CGA GAC CCC ATG ACT CGG GTG CAC TCC AAA	960
Val Leu Asp Leu Gly His Arg Asp Pro Met Thr Arg Val His Ser Lys	
305 310 315 320	
AGC GTG ACC AGG GAA GAG GCT CCC GAG CAA GGT GTG CAA AGC AAG ATT	1008
Ser Val Thr Arg Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys Ile	
325 330 335	
GCC TCA GTC GCT ATC AGC CAT CCA CAG GAC TCG GAC ACA CTG CTA GTG	1056
Ala Ser Val Ala Ile Ser His Pro Gln Asp Ser Asp Thr Leu Leu Val	
340 345 350	
CAA GAG CCG TCT TGA	1071
Gln Glu Pro Ser	
355	

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 356 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met	Gln	Thr	Arg	Lys	Ile	Val	Arg	Ala	Ala	Ala	Val	Gln	Ala	Ala	Ser
1				5				10					15		
Pro	Asn	Tyr	Asp	Leu	Ala	Thr	Gly	Val	Asp	Lys	Thr	Ile	Glu	Leu	Ala
				20				25					30		





Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly Cys Asp Leu Ile Val Phe Gly Glu Thr  
 35 40 45  
 Trp Leu Pro Gly Tyr Pro Phe His Val Trp Leu Gly Ala Pro Ala Trp  
 50 55 60  
 Ser Leu Lys Tyr Ser Ala Arg Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Ser Leu Asp  
 65 70 75 80  
 Ser Ala Glu Phe Gln Arg Ile Ala Gln Ala Ala Arg Thr Leu Gly Ile  
 85 90 95  
 Phe Ile Ala Leu Gly Tyr Ser Glu Arg Ser Gly Gly Ser Leu Tyr Leu  
 100 105 110  
 Gly Gln Cys Leu Ile Asp Asp Lys Gly Glu Met Leu Trp Ser Arg Arg  
 115 120 125  
 Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Val Phe Gly Glu Gly Tyr  
 130 135 140  
 Ala Arg Asp Leu Ile Val Ser Asp Thr Glu Leu Gly Arg Val Gly Ala  
 145 150 155 160  
 Leu Cys Cys Trp Glu His Leu Ser Pro Leu Ser Lys Tyr Ala Leu Tyr  
 165 170 175  
 Ser Gln His Glu Ala Ile His Ile Ala Ala Trp Pro Ser Phe Ser Leu  
 180 185 190  
 Tyr Ser Glu Gln Ala His Ala Leu Ser Ala Lys Val Asn Met Ala Ala  
 195 200 205  
 Ser Gln Ile Tyr Ser Val Glu Gly Gln Cys Phe Thr Ile Ala Ala Ser  
 210 215 220  
 Ser Val Val Thr Gln Glu Thr Leu Asp Met Leu Glu Val Gly Glu His  
 225 230 235 240  
 Asn Ala Pro Leu Leu Lys Val Gly Gly Gly Ser Ser Met Ile Phe Ala  
 245 250 255  
 Pro Asp Gly Arg Thr Leu Ala Pro Tyr Leu Pro His Asp Ala Glu Gly  
 260 265 270  
 Leu Ile Ile Ala Asp Leu Asn Met Glu Glu Ile Ala Phe Ala Lys Ala  
 275 280 285  
 Ile Asn Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Lys Pro Glu Ala Thr Arg Leu  
 290 295 300  
 Val Leu Asp Leu Gly His Arg Asp Pro Met Thr Arg Val His Ser Lys  
 305 310 315 320



Ser Val Thr Arg Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys Ile  
325 330 335

Ala Ser Val Ala Ile Ser His Pro Gln Asp Ser Asp Thr Leu Leu Val  
340 345 350

Gln Glu Pro Ser  
355

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 39 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Alcaligenes faecalis*

(B) STAMM: 1650

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: Nitrilase

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Met Gln Thr Arg Lys Ile Val Arg Ala Ala Ala Val Gln Ala Ala Ser  
1 5 10 15

Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr Gly Val Asp Lys Thr Ile Glu Leu Ala  
20 25 30

Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly  
35

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 21 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN



6

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Alcaligenes faecalis*

(B) STAMM: 1650

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: Nitrilase

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Glu	Glu	Ala	Pro	Glu	Gln	Gly	Val	Gln	Ser	Lys	Ile	Ala	Ser	Val	Ala
1				5				10						15	

Ile	Ser	His	Pro	Gln
			20	

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 11 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Alcaligenes faecalis*

(B) STAMM: 1650

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: Nitrilase

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Glu	Glu	Ala	Pro	Glu	Gln	Gly	Val	Gln	Ser	Lys
1				5				10		

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear



7

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: *Alcaligenes faecalis*
  - (B) STAMM: 1650
- (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
  - (B) CLON: Nitrilase
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

ATGCAGACNA GNAARATCGT SCG

23

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzel
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: *Alcaligenes faecalis*
  - (B) STAMM: 1650
- (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
  - (B) CLON: Nitrilase
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

TNGCSACNGA NGCRATCTTG

20

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzel
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTISENSE: NEIN





(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Alcaligenes faecalis*

(B) STAMM: 1650

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: Nitrilase

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

TTAATCATAT GCAGACAAGA AAAATCGTCC G

31

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 32 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Alcaligenes faecalis*

(B) STAMM: 1650

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: Nitrilase

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

AAGGATCCTC AAGACGGCTC TTGCACTAGC AG

32



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/07679

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N9/78 C12N15/55 C12N1/21 C12N15/63 C12P41/00  
C12P7/42 //(C12N9/78,C12R1:05)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOBAYASHI M ET AL: "NITRILASE IN BIOSYNTHESIS OF THE PLANT HORMONE INDOLE-3-ACETIC ACID FROM INDOLE-3-ACETONITRILE: CLONING OF THE ALCALIGENES GENE AND SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF CYSTEINE RESIDUES" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, vol. 90, 1 January 1993 (1993-01-01), pages 247-251, XP002036846 ISSN: 0027-8424 See figure --- -/--	1,2

☒

Further documents are listed in the continuation of box C.

☒

Patent family members are listed in annex.

## ° Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 March 2000

Date of mailing of the international search report

22/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Alt, G

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

onal Application No

PCT/EP 99/07679

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 00, no. 18471, 2 April 1994 (1994-04-02) & JP 06 153968 A (NITTO CHEM.IND. LTD), 3 June 1994 (1994-06-03) abstract ----	1,2
X	NAGASAWA, T. ET AL.: "A novel nitrilase, arylacetonitrilase, of Alcaligenes faecalis JM3" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 194, 1990, pages 765-772, XP000881330 cited in the application See pages 767-769 ----	2
Y	EP 0 348 901 A (ASAHI CHEMICAL IND) 3 January 1990 (1990-01-03) See example 11 ----	1-15
Y	YAMAMOTO, K. ET AL.: "Purification and characterization of the nitrilase from Alcaligenes faecalis ATCC8750 responsible for enantioselective hydrolysis of mandelonitrile" JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, vol. 73, no. 6, 1992, pages 425-430, XP002132430 See the whole document ----	1-15
Y	EP 0 449 648 A (NITTO CHEMICAL INDUSTRY CO LTD) 2 October 1991 (1991-10-02) See example 2,3 and 13; "Comparative Example" 1 -----	1-15

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/07679

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 06153968 A	03-06-1994	NONE	
<hr/>			
EP 0348901 A	03-01-1990	DE 68925002 D	18-01-1996
		DE 68925002 T	29-08-1996
		DK 314989 A	28-12-1989
		JP 2084198 A	26-03-1990
		JP 2623345 B	25-06-1997
		US 5283193 A	01-02-1994
<hr/>			
EP 0449648 A	02-10-1991	JP 2696424 B	14-01-1998
		JP 4099495 A	31-03-1992
		JP 2698936 B	19-01-1998
		JP 4099496 A	31-03-1992
		DE 69131217 D	17-06-1999
		DE 69131217 T	23-09-1999
		JP 2696436 B	14-01-1998
		JP 4218385 A	07-08-1992
		US 5223416 A	29-06-1993
<hr/>			



# INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07679

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N9/78 C12N15/55 C12N1/21 C12N15/63 C12P41/00  
C12P7/42 //(C12N9/78,C12R1:05)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
------------	--	--------------------

X	KOBAYASHI M ET AL: "NITRILASE IN BIOSYNTHESIS OF THE PLANT HORMONE INDOLE-3-ACETIC ACID FROM INDOLE-3-ACETONITRILE: CLONING OF THE ALCALIGENES GENE AND SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF CYSTEINE RESIDUES" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,US,NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, Bd. 90, 1. Januar 1993 (1993-01-01), Seiten 247-251, XP002036846 ISSN: 0027-8424 siehe Abbildung	1,2
---	---	-----

---  
-/--



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. März 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

22/03/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Alt, G

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>2</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 00, no. 18471, 2. April 1994 (1994-04-02) & JP 06 153968 A (NITTO CHEM.IND. LTD), 3. Juni 1994 (1994-06-03) Zusammenfassung ---	1,2
X	NAGASAWA, T. ET AL.: "A novel nitrilase, arylacetonitrilase, of <i>Alcaligenes</i> <i>faecalis</i> JM3" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 194, 1990, Seiten 765-772, XP000881330 in der Anmeldung erwähnt siehe Seiten 767-769 ---	2
Y	EP 0 348 901 A (ASAHI CHEMICAL IND) 3. Januar 1990 (1990-01-03) siehe Beispiel 11 ---	1-15
Y	YAMAMOTO, K. ET AL.: "Purification and characterization of the nitrilase from <i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC8750 responsible for enantioselective hydrolysis of mandelonitrile" JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, Bd. 73, Nr. 6, 1992, Seiten 425-430, XP002132430 siehe das gesamte Dokument ---	1-15
Y	EP 0 449 648 A (NITTO CHEMICAL INDUSTRY CO LTD) 2. Oktober 1991 (1991-10-02) siehe Beispiele 2, 3 and 13; "Comparative Example" 1 -----	1-15



# INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07679

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
JP 06153968 A	03-06-1994	KEINE	
EP 0348901 A	03-01-1990	DE 68925002 D	18-01-1996
		DE 68925002 T	29-08-1996
		DK 314989 A	28-12-1989
		JP 2084198 A	26-03-1990
		JP 2623345 B	25-06-1997
		US 5283193 A	01-02-1994
EP 0449648 A	02-10-1991	JP 2696424 B	14-01-1998
		JP 4099495 A	31-03-1992
		JP 2698936 B	19-01-1998
		JP 4099496 A	31-03-1992
		DE 69131217 D	17-06-1999
		DE 69131217 T	23-09-1999
		JP 2696436 B	14-01-1998
		JP 4218385 A	07-08-1992
		US 5223416 A	29-06-1993

